

**Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen
des Melatonins in der *Pars tuberalis* (PT) und im Gehirn von Mäusen**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von
Dipl. Biol. Claudia Unfried
aus Langen in Hessen

Betreuerin: Frau PD Dr. Charlotte von Gall
Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Ralf Galuske

Tag der Einreichung: 12.09.2008
Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2008

Darmstadt 2008
D17

Die Dissertation wurde angefertigt in der Emmy Noether-Nachwuchsgruppe der Experimentellen Neurobiologie am Institut für Anatomie II der Dr. Senkenbergischen Anatomie an der Goethe Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Horst-Werner Korf und der Betreuung von PD Dr. Charlotte von Gall.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Rödermark, den 12. September 2008

Claudia Unfried, Diplom-Biologin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Rhythmen	2
1.2	Photoneuroendokrines System	4
1.3	Melatonin	6
1.3.1	Wirkung des Melatonins auf den zentralen Oszillator	6
1.4	Molekulare Grundlagen der inneren Uhr	7
1.5	<i>Pars tuberalis</i>	14
1.5.1	Wirkung des Melatonins auf die Uhrenexpression in der <i>Pars tuberalis</i>	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Versuchstiere	23
2.1.1	Haltung	23
2.1.2	Manipulation der Versuchstiere	24
2.1.3	Genotypisierung	24
2.2	Gewebeentnahme	26
2.3	Gefrierschnitttherstellung.....	26
2.4	Lasermikrodissektion	27
2.4.1	Analyse der Dissektate	28
2.5	Mikroarray-Hybridisierung	29
2.6	<i>In situ</i> -Hybridisierung	29
2.6.1	Radioaktiv-markierte ³³ P-Oligonukleotidsonden	30
2.6.2	Aufreinigung radioaktiv-markierter Sonden	30
2.6.3	Oligonukleotide.....	31
2.6.4	Hybridisierung	33

2.6.5	Entwicklung autoradiographischer Filme	34
2.7	Stimulation hypothalamischer Schnittpräparate	34
2.8	Hormonkonzentrationsbestimmung	35
2.9	Hämalaun-Eosin-Färbung	35
2.10	Immunzytochemie	36
2.11	Densitometrische Analyse	37
2.12	Statistik	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Differentielle Genexpression in der <i>Pars tuberalis</i> von WT und MT1ko-Mäusen	39
3.1.1	Integrität der Gesamt-RNA	39
3.1.2	Mikroarray-Analyse	41
3.1.2.1	Charakterisierung der Gene mit einer Melatonin-abhängigen Expression in der <i>Pars tuberalis</i>	44
3.1.2.2	Charakterisierung der Gene, deren Expression in der <i>Pars tuberalis</i> durch den negativen Regulatorkomplex gesteuert wird	48
3.2	Analyse differentiell exprimierter Gene von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen mit Hilfe der <i>in situ</i> -Hybridisierung	53
3.2.1	Steuerung der Genexpression transkriptioneller Regulatoren	55
3.2.1.1	Steuerung der <i>Cry1</i> -Genexpression.....	55
3.2.1.2	Steuerung der <i>Tim</i> -Genexpression	58
3.2.1.3	Steuerung der <i>Dbp</i> -Genexpression.....	61
3.2.1.4	Steuerung der <i>Npas4</i> -Genexpression	71
3.2.1.5	Steuerung der <i>Neurod1</i> -Genexpression	76
3.2.2	Steuerung von Genen, die an endokrinen Prozessen beteiligt sind	78

3.2.2.1	Steuerung der <i>Pomc1</i> -Genexpression.....	78
3.2.2.2	Steuerung der <i>Esr1</i> -Genexpression	81
3.2.2.3	Steuerung der <i>Tafa3</i> -Genexpression.....	83
3.2.2.4	Steuerung der <i>Lhb</i> -Genexpression.....	86
3.2.2.5	Steuerung der <i>Fshb</i> -Genexpression.....	88
3.2.2.6	Steuerung der <i>Tshr</i> -Genexpression.....	90
3.2.2.7	Steuerung der <i>Tshb</i> -Genexpression.....	94
3.3	Untersuchung zur Rhythmizität von TSHb in der <i>Pars tuberalis</i>	97
3.4	Wirkung von TSH in der Ependymschicht des III. Ventrikels der Maus	102
3.4.1	TSH-Stimulation führt zur Phosphorylierung von CREB in der Ependymschicht des III. Ventrikels und der <i>Pars tuberalis</i>	102
3.4.2	TSH induziert die <i>Dio2</i> -Genexpression in der Ependymschicht des III. Ventrikels	104
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	106
4	Diskussion	107
5	Zusammenfassung.....	137
6	Summary	139
7	Glossar	141
8	Literatur	145
	Danksagung	176
	Lebenslauf	177

1 Einleitung

Das übergeordnete Thema der vorliegenden Arbeit ist das circadiane System der Säugetiere (Aschoff 1960), bekannt auch als „innere“ oder „biologische“ Uhr. Diese innere Uhr ermöglicht dem Organismus eine optimale zeitliche Anpassung an die sich verändernden Beleuchtungsverhältnisse unserer Umwelt. Zentrale Elemente des circadianen Systems der Säugetiere sind die Retina, welche den Eingang in die innere Uhr darstellt, der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus, welcher die innere Uhr beherbergt, und photoneuro-endokrine Effektoren wie das Pinealorgan oder die *Pars tuberalis* (PT).

Ein wichtiges Ausgangssignal des circadianen Systems ist das Hormon Melatonin. In Abhängigkeit von der aktuellen Photoperiode wird Melatonin rhythmisch im Pinealorgan synthetisiert (Klein et al., 1991). Bei allen Wirbeltieren wird Melatonin ausschließlich während der Nacht synthetisiert und sezerniert und zwar unabhängig davon, ob der entsprechende Organismus tag- (diurnal) oder nachtaktive (nocturnal) ist. Der nächtliche Anstieg des Melatoninspiegels ist somit ein wichtiges endogenes Signal für die Dunkelheit. Daher nimmt Melatonin als Dunkelhormon eine zentrale Rolle innerhalb des circadianen Systems ein. Es wirkt über Melatoninrezeptoren, welche in vielen Hirnregionen (Reiter 1991; Roca et al., 1996; Lui et al., 1997b; Drew et al., 2001; Savaskan et al., 2002) vorkommen, unter anderem im SCN. Dort moduliert es u.a. den Lichteingang in die innere Uhr (Kopp et al., 1997; von Gall et al., 1998). Melatonin reduziert die Hypoxie-induzierte Genexpression in vielen Hirnarealen, z.B. in den *Nuclei habenulares* (NH) und im Hippocampus (Zamorskii und Pishak 2000) und moduliert die Gedächtniskonsolidierung (Gorfine et al., 2006, 2007). Die Dauer des nächtlichen Melatoninsignals ist abhängig von der Länge der Nacht (Goldman 2001). Daher stellt Melatonin auch das

wichtigste Signal für saisonale Prozesse dar. Melatoninrezeptoren im mediobasalen Hypothalamus (MBH) sind für saisonale Schwankungen der Gonadotropine verantwortlich (Maywood und Hastings 1995). Daraus resultieren die jahreszeitlichen Veränderungen der Fortpflanzungstätigkeit, z.B. bei Hamster und Schaf. Melatoninrezeptoren in der PT (Morgan 2000) vermitteln die saisonalen Schwankungen von Prolaktin in der adenohipophysären *Pars distalis* (PD). Prolaktin reguliert antizipatorisch die saisonalen Veränderungen in der Stoffwechselrate, dem Reproduktionsverhalten und der Felldichte (Ross und Morgan 2002). Diese saisonalen Effekte dürften über Melatoninrezeptoren vom SCN im Hypothalamus und der hypophysären PT vermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird an verschiedenen Mäusestämmen untersucht, ob und wie eine gezielte Deletionen der Melatoninrezeptoren die Genexpression in unterschiedlichen Hirnarealen und in der Hypophyse beeinflussen.

1.1 Biologische Rhythmen

Zeitliche Organisation ist bei allen lebenden Organismen von großer Bedeutung. Daher ist es nicht verwunderlich, dass bei allen bis heute untersuchten Lebewesen rhythmische Vorgänge gefunden wurden. Diese reichen von Millisekunden bis zu Jahren. Bei Säugetieren beeinflusst der rhythmische Wechsel von Tag und Nacht wesentlich das Verhalten, aber auch eine Vielzahl von zentral regulierten stoffwechselphysiologischen Prozessen (Klein et al., 1991). Bei tagaktiven Säugetieren geht z.B. ein erhöhter Kortisolspiegel am Morgen mit der Aktivitätsphase (Aschoff 1984) einher, während mit dem Anstieg des

Melatoningehalts bei Nacht, die Ruhephase eingeleitet wird. Man spricht von circadianen Rhythmen (*circa*: ungefähr; *dies*: der Tag), wenn diese auch ohne den Einfluss äußerer, periodisch verlaufender Umgebungsreize (Zeitgeber), wie z.B. Licht oder regelmäßige Nahrungsaufnahme, mit einer Periodenlänge von etwa 24 Stunden beibehalten werden (Aschoff et al., 1971). Diese circadianen Rhythmen werden von der inneren Uhr im SCN angetrieben und laufen auch unter Dauer-Dunkel-Bedingungen weiter. Um zu überprüfen, ob ein tageszeitlicher Rhythmus durch die innere Uhr angetrieben wird, werden die Versuchspersonen bzw. die Versuchstiere konstanten Umweltbedingungen ausgesetzt. Im Gegensatz zum objektiven Tag und zur objektiven Nacht (*Zeitgeber time*; ZT) des astrophysikalischen Tages lassen sich auch beim circadianen Rhythmus Tag- und Nacht-Phasen (z.B. Ruhe- und Aktivitätsphasen) unterscheiden, die als subjektiver Tag und subjektive Nacht (*circadian time*; CT) bezeichnet werden.

Bei Säugetieren befindet sich der zentrale endogene Oszillator, der den circadianen Rhythmus generiert (Reppert und Weaver 2001), im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) einem paarigen, bilateralen Kerngebiet im Hypothalamus, direkt dorsal vom *Chiasma opticum* und lateral des III. Ventrikels (Stephan und Zucker 1972; Green und Gillette 1982). Diese innere Uhr generiert einen endogenen circadianen Rhythmus, dessen Periodenlänge und Phasenlage über die Perzeption von Lichtreizen aus der Retina mit der aktuellen Photoperiode synchronisiert wird. Der SCN produziert rhythmische neuronale und humorale Signale, über die er untergeordnete periphere Oszillatoren, wie z.B. Leber (Schibler et al., 2003), Niere (Yoo et al., 2004) und PT (von Gall et al., 2000) synchronisiert.

Wird der SCN zerstört, verschwinden sämtliche circadianen Rhythmen in Physiologie und Verhalten (Moore und Lenn 1972; Watanabe et al., 1981).

Bei der Maus besteht der SCN aus ca. 20.000 Neuronen. Aufgrund der lokal unterschiedlichen Ausstattung der SCN-Neurone mit Neuropeptiden sowie unterschiedlicher Funktionen wird der SCN in zwei topographische Untereinheiten gegliedert. Eine ventro-laterale Formation, die auch als „Kern“ (*core*) des SCN bezeichnet wird, dient vor allem zur Integration aller Eingangssignale. Ein dorso-mediales Areal, das auch als „Mantel“ (*shell*) bezeichnet wird (Moore et al., 2002), enthält die Rhythmus-generierenden Neurone, die wiederum rhythmische Ausgangssignale produzieren (Liu und Reppert 2000).

1.2 Photoneuroendokrines System

Der Regelkreis, welcher den photischen Eingang in die innere Uhr, den SCN selbst und neuroendokrine Effektoren beinhaltet, wird bei Wirbeltieren als photoneuroendokrines System (PNS) bezeichnet (Abb. 1; Korf 1994, 1996). Im Jahr 1964 definierte Ernst Scharrer erstmalig ein Konzept für das PNS. Demnach dienen photoneuroendokrine Systeme der Wahrnehmung und Umwandlung von Lichtinformationen in eine neuroendokrine Antwort (Scharrer 1964). Die aktuelle Photoperiode wird von der Retina aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) an den SCN weitergeleitet (Moore et al., 1972; Johnson et al., 1988). Die Informationen aus dem SCN werden über einen multisynaptischen Weg zum *Ganglion cervicale superius* (GCS) weitergeleitet, von wo aus sympathische, postganglionäre Nervenfasern zum Pinealorgan (PIN) ziehen. Die rhythmische Freisetzung von Noradrenalin aus den postganglionären Nervenfasern treibt die rhythmische Melatonin synthese im Pinealorgan an. Noradrenalin wird verstärkt während der Nacht freigesetzt. Dies führt zur gesteigerten

nächtlichen Melatoninsynthese (Korf 1996). Melatonin wird ausschließlich während der Nacht aus den neuroendokrinen Zellen des Pinealorgans, den Pinealozyten, in die Blutbahn sezerniert (Borjigin et al., 1995; Coon et al., 1995; Maronde et al., 1999). Melatonin beeinflusst unter anderem die Rhythmogenese in SCN und PT und ist somit an der Bildung einer Rückkopplungsschleife im PNS beteiligt (Weaver 1999).

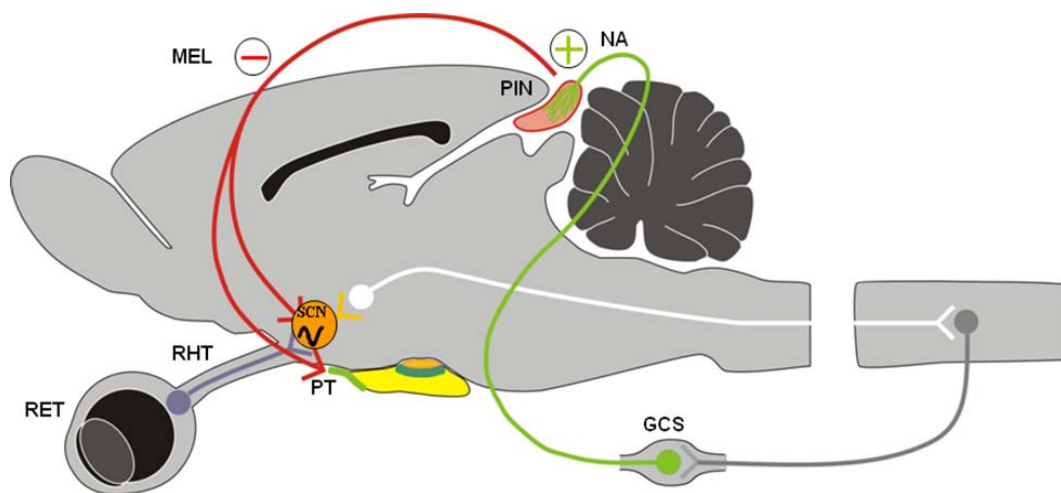


Abb. 1: Schema des photoneuroendokrinen Systems (PNS) der Säugetiere.

Das PNS erhält seine Lichtafferenz aus der Retina (RET) über den retino-hypothalamischen Trakt (RHT), welcher zum *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) projiziert. Von hier gelangt die Information über einen multisynaptischen Weg zum *Ganglion cervicale superius* (GCS). Postganglionäre Nervenfasern des GCS ziehen zum Pinealorgan (PIN). Das durch Freisetzung von Noradrenalin (NA) synthetisierte und sezernierte Melatonin (MEL) erreicht über humorale Projektionen den SCN und periphere Organe, wie die *Pars tuberalis* (PT) und ist somit an der Bildung einer Rückkopplungsschleife im PNS beteiligt (modifiziert nach Korf 1996).

1.3 Melatonin

Das Indolamin Melatonin wurde im Jahr 1960 erstmalig von Aaron Lerner aus dem Pinealorgan des Rindes isoliert (Lerner et al., 1960). Sein Name stammt von der Beobachtung, dass sich die Melanophoren des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) nach Behandlung mit Melatonin wie durch einen Tonus zusammenziehen.

1.3.1 Wirkung des Melatonins auf den zentralen Oszillator

Die rhythmische Synthese und Freisetzung des Melatonins wird bei Säugetieren durch die innere Uhr im SCN gesteuert und durch die nächtliche Freisetzung von Noradrenalin getriggert (Klein 1985), d.h. Licht hemmt akut die nächtliche Melatoninsynthese und -freisetzung. Folglich ist Melatonin als Botenstoff der Dunkelheit und zugleich als ein „Zeithormon“ (*timing hormone*) anzusehen (Korf et al., 1998). Über die Melatoninrezeptoren im SCN (Vanecek et al., 1987) bildet Melatonin eine Rückkopplungsschleife im circadianen System.

So kann Melatonin die elektrische Aktivität von SCN-Neuronen unterdrücken und zu bestimmten Zeitpunkten die Phase des circadianen Rhythmus im SCN verschieben (Liu et al., 1997a). Dadurch ergänzt Melatonin die Informationen, welche der RHT dem SCN über die beiden Neurotransmitter Glutamat und PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) vermittelt. Bei Menschen, die ihre Phasenbeziehung zur Umwelt verloren haben, wie z.B. bei kongenitaler oder erworbener Blindheit (Demisch et al., 1987; Arendt 1995, 2003) und bei Winterdepression (*seasonal affective disorder*, SAD; Wehr et al., 2001), wird Melatonin therapeutisch zur Resynchronisation eingesetzt.

Bei Mäusen führt die Applikation des Melatonins zur Phasenverschiebung endogener Rhythmen, z.B. der lokomotorischen Aktivität (Redman et al., 1983, 1997) und bewirkt in Abhängigkeit von der Tageszeit der Applikation, z.B. am späten subjektiven Tag, eine Phasenbeschleunigung (McArthur et al., 1991; Starkey et al., 1995). Darüber hinaus kann Melatonin eine Licht-induzierte Erhöhung der Aktivität des Sympathikus reduzieren (Mutoh et al., 2003).

Diese unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften des Melatonins werden über hoch-affine G_i -Protein gekoppelte Melatoninrezeptoren vermittelt. Sie wirken hauptsächlich inhibitorisch auf die Konzentration sekundärer Botenstoffe (Carlson et al., 1989), wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Der sekundäre Botenstoff cAMP aktiviert spezifische Proteinkinasen, z.B. die Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren, z.B. CREB (*Ca²⁺/cAMP responsive element-binding protein*) aktiviert.

1.4 Molekulare Grundlagen der inneren Uhr

Die molekulare Grundlage der Erzeugung circadianer Rhythmen bilden transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleifen sogenannter Uhrgene. Bei Deletion dieser Uhrgene verändert sich die Periodenlänge der circadianen Rhythmen oder sie kommen ganz zum Erliegen. Bemerkenswert ist, dass circadiane Rhythmen der Uhrgene und deren Translationsprodukte nicht nur im SCN vorkommen, sondern in allen bislang untersuchten Geweben (Yoo et al., 2004). Nahezu alle Gehirnregionen (Abe et al., 2002), die hypophysäre PT (von Gall et al., 2002b; Jilg et al., 2005), periphere Gewebe (Yamzaki et al., 2000) und

diverse Zelllinien (Balsalobre et al., 1998) zeigen einen circadianen Rhythmus der Uhrengenexpression.

Seit der Entdeckung des ersten Uhrengens Period (*Per*) durch Mutagenesestudien bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Rosbash und Hall 1989) wurde durch zahlreiche Studien belegt, dass bei Säugetieren ähnliche molekulare Mechanismen zur Generierung circadianer Rhythmen zu Grunde liegen. Die Sequenzhomologie von *Per* aus *Drosophila* (*dPer*) mit *Per* aus Maus (*mPer*; Sherman et al., 1997; Sun et al., 1997), zeigt, dass der Uhrenmechanismus im Verlaufe der Phylogenie sehr stark konserviert wurde und belegt die Bedeutung der Rhythmogenese in der Evolution der Arten (Dunlap et al., 2004b).

Der molekulare Mechanismus der circadianen Rhythmogenese basiert auf transkriptionalen/translationalen Rückkopplungsschleifen. Hierbei greifen nukleäre Proteine als transkriptionelle Regulatoren aktivierend oder hemmend in die Genexpression ein (Abb. 2; Reppert et al., 2002).

Die beiden Uhrengenproteine CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) und BMAL1 (*brain and muscle Arntl-like*) (Gekakis et al., 1998) stellen die wichtigsten positiven Elemente dieser Rückkopplungsschleife dar (Reppert und Weaver 2002). Sie gehören in die Gruppe der basic Helix-Loop-Helix (bHLH)/PAS (*Per*, *Arnt*, *Sim*) -Familie. CLOCK und BMAL1 heterodimerisieren im Zytoplasma und werden in den Zellkern transloziert, wo sie die Expression anderer Uhrengene, wie Period1-3 (*Per*; Sun et al., 1997) und Cryptochrom1-2 (*Cry*; van der Horst et al., 1999) aber auch andere Uhren-kontrollierte Gene (*clock controlled genes*; ccgs) über deren E-Box-Promoterelemente aktivieren. Im SCN folgt das Maximum der Proteinmenge an PER und CRY zu Beginn der subjektiven Nacht (CT12) dem Maximum der mRNA-Transkripte in der Mitte des subjektiven Tages (CT06).

Die mit ungefähr sechs Stunden Verzögerung akkumulierten Genprodukte PER1-3 und CRY1-2 werden von den Kaseinkinasen ϵ und δ (CK1) im Zytoplasma phosphoryliert. Dabei bestimmt der Grad der Phosphorylierung durch die CK1 ϵ die Konzentration an PER1.

Die PER- und CRY-Proteine bilden im SCN in der frühen subjektiven Nacht einen negativen Regulatorkomplex (NRC), welcher in den Kern zurückwandert. Dort bindet der Komplex mit einer zeitlichen Verzögerung an den aktivierten CLOCK/BMAL1 Komplex, wodurch eine weitere Uhren-genexpression gehemmt (Lee et al., 1998; Kume et al., 1999) und somit die Rückkopplungsschleife nach einem circadianen Zyklus (~24 Stunden) geschlossen wird. Durch weitere Phosphorylierung wird der NRC der proteasomalen Degradierung zugeführt, wodurch ein neuer Zyklus anläuft.

Eine gezielte Deletion des *Cry1*-Gens führt zur Verkürzung der circadianen Periode, während ein Defekt im *Cry2*-Gen eine Verlängerung der circadianen Periode hervorruft (van der Horst et al., 1999). Bei einer Doppeldeletion von *Cry1* und *Cry2* kommt es dagegen zum kompletten Verlust der circadianen Rhythmik der lokomotorischen Aktivität (van der Horst et al., 1999). Beim Menschen führen einzelne Mutationen in Uhrengenen zu einer Änderung der endogenen Periodenlänge, woraus massive Schlafstörungen resultieren (Toh et al., 2001).

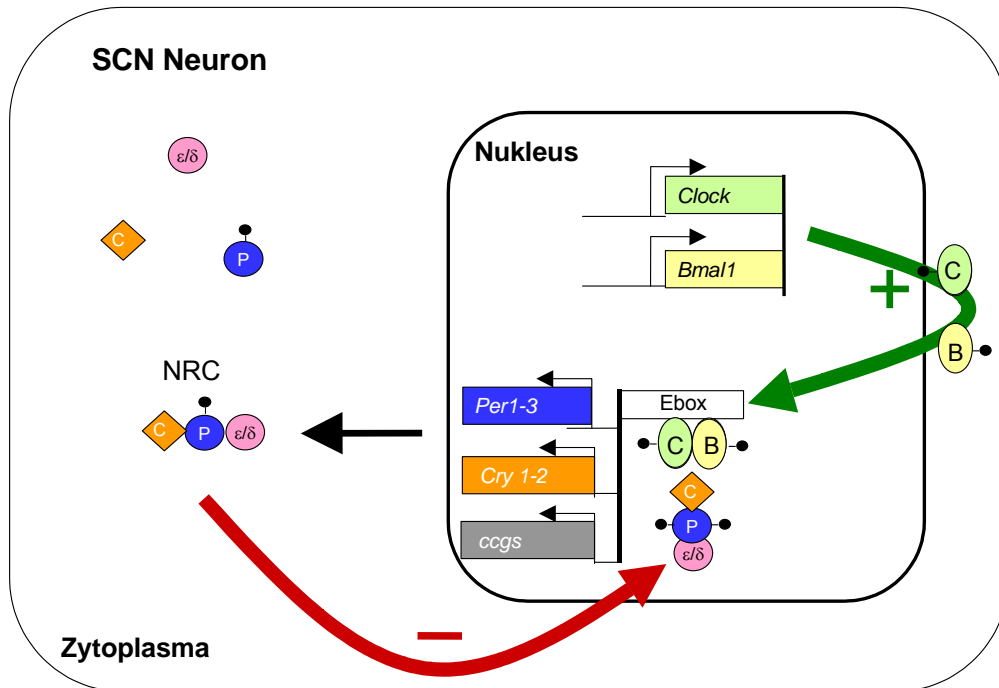


Abb. 2: Modell der molekularen Grundlagen der inneren Uhr im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) bei Säugetieren.

CLOCK (C) und BMAL1 (B) regulieren als positive Elemente die Expression von *Per1-3*, *Cry1-2* und weiteren Uhren-kontrollierten-Genen (*ccgs*). Die PER-Proteine (P) werden von den Kaseinkinasen ϵ und δ (ϵ/δ) phosphoryliert und bilden mit den CRY-Proteinen (C) einen negativen Regulatorkomplex (NRC). Dieser NRC hemmt die CLOCK/BMAL1 vermittelte Transkription und schließt die Rückkopplungsschleife (modifiziert nach Reppert und Weaver 2002).

Antiphasisch zur ersten Rückkopplungsschleife wird die Expression von *Clock* und *Bmal1* durch die Transkriptionsfaktoren REV-ERB α (*orphan nuclear receptor*; Preitner et al., 2002) und ROR α (*retinoic acid-related orphan receptor*; Akashi und Takumi 2005) reguliert. Jedoch ist die Bedeutung dieser zweiten Rückkopplungsschleife gering, da CLOCK und BMAL1 konstitutiv gebildet werden und stets an die DNA binden (Lee et al., 2001). Der Uhrenmechanismus wird hauptsächlich durch das rhythmische Vorhandensein des NRC angetrieben (Lee et al., 2001).

Der zentrale Mechanismus der Rhythmogenese unterscheidet sich nicht wesentlich zwischen SCN und untergeordneten Oszillatoren. Jedoch sind periphere Oszillatoren wie Lunge und Leber stärker von CLOCK abhängig als der SCN, wo CLOCK durch NPAS2 substituiert werden kann (DeBryune et al., 2007). Darüber hinaus gibt es gewebespezifische Unterschiede, welche Gene rhythmisch durch das molekulare Uhrwerk angetrieben werden. Die rhythmische Expression gewebespezifischer *ccgs* sorgt für zeitlich optimierte Funktionen im entsprechenden Gewebe bzw. Organ. So werden z.B. in der Leber antizipatorisch bereits vor dem erwarteten Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme Gene, die für Enzyme des Stoffwechsels und der Entgiftung kodieren, aktiviert.

Zu den eindeutig identifizierten *ccgs* im SCN gehört u.a. das Arginin-Vasopressin (AVP), das als ein zentrales Ausgangssignal der inneren Uhr den Rhythmus des SCN humoral an andere Hirnregionen vermittelt (Tousson und Meissl 2004). Ein weiteres *cgc* kodiert für das Albumin D-Element-bindende Protein (DBP), das rhythmisch sowohl im SCN (Yamaguchi et al., 2000) als auch in der Leber exprimiert wird (Ripperger et al., 2000). DBP ist ein DNA-Bindungsprotein, das u.a. aktivierend auf die *Per1*-Expression im SCN wirkt (Yamaguchi et al., 2000; Okamura et

al., 2002). In der Leber ist DBP ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen, die an Stoffwechsel- und Entgiftungsprozessen beteiligt sind, steuert.

Mikroarraystudien weisen darauf hin, dass es noch viele weitere *ccgs* in unterschiedlichen Geweben gibt (Akhtar et al., 2002; Panda et al., 2002; Duffield et al., 2002, 2003).

Der SCN synchronisiert periphere Oszillatoren miteinander und gibt Periodenlänge und Phasenlage vor. Dabei gibt es Gewebe-spezifische Unterschiede, wie stark ein peripherer Oszillator von einem endogenen Faktor abhängt, d.h. wie schnell er in Abwesenheit dieses Faktors ausschwingt (Yoo et al., 2004). Einige periphere Oszillatoren, z.B. Leber und Herz sind in der Lage auch ohne rhythmische Signale einen circadianen Rhythmus der Uhrogenexpression aufrecht zu erhalten (Yoo et al., 2004). In anderen periphere Oszillatoren, wie z.B. in der Niere (Yoo et al., 2004) oder PT (von Gall et al., 2002) kommt die rhythmische Uhrogenexpression in Abwesenheit rhythmischer Eingangssignale sehr schnell zum Erliegen.

Meist dienen in einem Gewebe mehrere Signale als synchronisierende Taktgeber. In der Leber wird die rhythmische Uhrogenexpression sowohl durch Kortisol und die Fütterungszeiten (Balsalobre et al., 2000; Stokkan et al., 2001) als auch durch neuronale Signale (Terazono et al., 2003) synchronisiert. Im Pinealorgan wird hingegen die rhythmische Melatoninsynthese und -freisetzung überwiegend durch Noradrenalin getriggert (Abb. 3). Die Sekretion des Melatonins wird über die eigene Syntheserate bestimmt (Korf et al., 1998). Zahlreiche Studien belegen, dass Melatonin der entscheidende Taktgeber für die PT ist (Messenger et al., 1999, 2000, 2001; von Gall et al., 2002a, 2005; Dardente et al., 2003b; Jilg et al., 2005; Johnston et al., 2005; Lincoln et al., 2005). Ohne ein kontinuierliches, rhythmisches Melatoninsignal kommt der Rhythmus der

Uhrengenenexpression in der PT zum Erliegen (Messager et al., 2001; von Gall et al., 2002a).

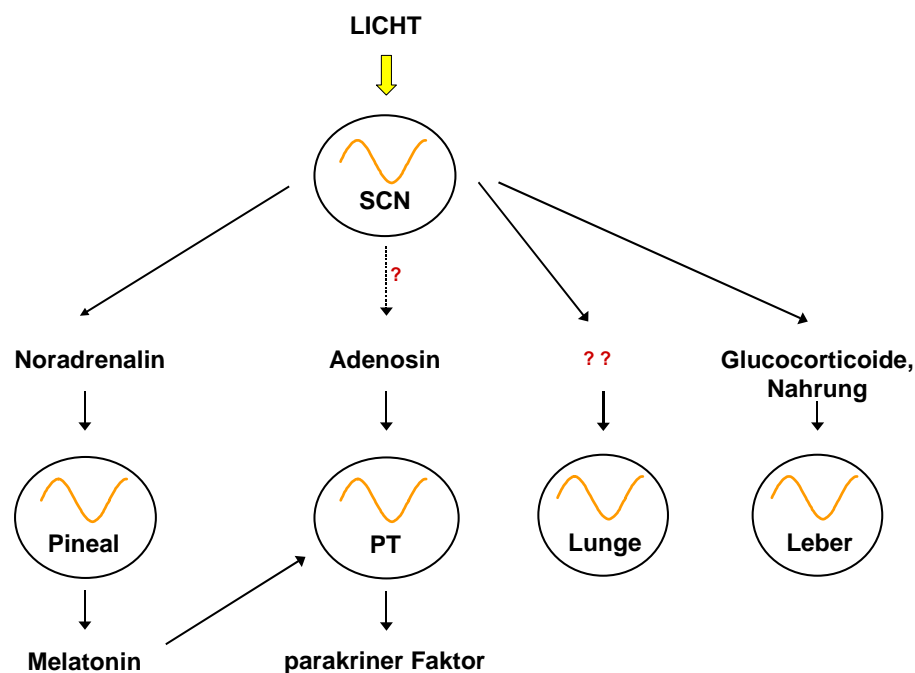


Abb. 3: Beziehung zwischen dem zentralen circadianen Rhythmusgenerator im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) und peripheren Oszillatoren.

Der circadiane Rhythmus im SCN wird durch Licht synchronisiert. Der SCN synchronisiert die verschiedenen peripheren Oszillatoren über unterschiedliche Mechanismen. Im Pinealorgan triggert Noradrenalin die rhythmische Synthese und Freisetzung des Melatonins, das durch die Interaktion mit Adenosin die rhythmische Funktion der *Pars tuberalis* (PT) aufrecht erhält. Hingegen wird die Anpassung des Rhythmus der Leberfunktion durch die rhythmische Freisetzung von Glucocorticoiden und die Nahrungsaufnahme bestimmt. Über die Übertragungsmechanismen vom SCN an andere periphere Oszillatoren, wie beispielsweise die Lunge, ist bislang wenig bekannt (modifiziert nach Korf und Stehle 2005).

1.5 *Pars tuberalis*

Die PT liegt rostral der Adenohypophyse und umrandet als dünne Zellschicht die *Eminentia mediana* (EM), durch die der Portalkreislauf führt. Es werden drei Zelltypen in der PT unterschieden: PT-spezifische, follikuläre- und PD-ähnliche Zellen (Wittkowski et al., 1999). Bemerkenswerterweise weist die PT von Nagetieren die höchste Dichte an hoch-affinen Melatoninrezeptoren auf (Weaver et al., 1991a; Morgan et al., 1994; Klosen et al., 2002; Dardente et al., 2003b). Nur im fötalen und frühen neonatalen Stadium sind Melatoninrezeptoren ebenfalls in der *Pars distalis* (PD) nachweisbar (Morgan et al., 1994). Daher wird die PT als Schnittstelle zwischen der zentralen Uhr im SCN und der endokrinen Adenohypophyse (PD) angesehen (von Gall 2007). Melatoninrezeptoren kommen auch in der Retina (Reppert et al., 1996), SCN (Liu et al., 1997b) sowie in anderen Hirnarealen (Drew et al., 2001) und in peripheren Organen, z.B. im Pankreas (Peschke et al., 2000) vor. Säugetiere besitzen zwei Subtypen von Melatoninrezeptoren: den MT1- (Mel_{1a}) und den MT2- (Mel_{1b}) Rezeptor (Reppert et al., 1996; Roca et al., 1996, Liu et al., 1997b). Kürzlich wurde gezeigt, dass, im Gegensatz zum MT1-Rezeptor, der MT2-Rezeptor bei der Regulation der Uhrengenexpression in der PT entbehrlich ist (von Gall et al., 2005). Beide Melatoninrezeptorsubtypen kommen in der PT nur in den PT-spezifischen Zellen vor (Klosen et al., 2002; Dardente et al., 2003).

Bei der photoperiodischen Regulation der Reproduktion von Tieren mit saisonalem Fortpflanzungsverhalten, z.B. bei Schafen setzt die PT einen derzeit noch nicht identifizierten parakrinen Faktor frei (Morgan et al., 1996; Wittkowski et al., 1999; Graham et al., 2002), das sogenannte „Tuberalin“ (Stirland et al., 2001). Dieser Faktor wurde zum ersten Mal

aufgrund einer Studie postuliert, die gezeigt hat, dass bei Schafen, deren Verbindung zwischen Hypothalamus und Hypophyse experimentell unterbrochen wurde, die Prolaktinfreisetzung aus der PD erhöht ist (Lincoln et al., 1994a). *In vitro* Versuche mit Ko-Kulturen von PD- und PT-Zellen bzw. mit Kulturmedium aus PT-Zellkulturen zeigten ebenfalls eine verstärkte Prolaktinfreisetzung (Morgen et al., 1996b). Melatonin hemmt offenbar die Freisetzung von „Tuberalin“ über Melatoninrezeptoren der PT (Morgan et al., 1994). MT1ko-Mäuse weisen nachts eine höhere Prolaktinkonzentration im Blutplasma auf als Wildtyp-Mäuse (von Gall et al., 2002a). Folglich könnte Melatonin die Tuberalinfreisetzung aus der PT über den MT1-Rezeptor und somit indirekt die rhythmische Prolaktinfreisetzung aus der PD hemmen.

In der PT sind die PD-spezifischen Hormone: Prolaktin (PRL), Wachstumshormon (*growth hormon*; GH) oder adrenokortikotrophes Hormon (ACTH) nicht nachweisbar (Wittkowski et al., 1999). Allerdings wird in PT-spezifischen Zellen die alpha- und beta-Untereinheit des luteinisierenden Hormons (*Lh*) und des Thyroidea-stimulierenden Hormons (*Tsh*) exprimiert (Böckers et al., 1996; Kameda et al., 1998; Wittkowski et al., 1999; Kell et al., 2005). Dabei zeigt sowohl die *Tshb*-Expression als auch der Proteingehalt einen tageszeitlichen Rhythmus (Aizawa et al., 2007). Eine Behandlung mit exogenem Melatonin führt zur Senkung der *Tshb*-mRNA-Spiegel, obwohl der maximale Proteingehalt zum Zeitgeber-Zeitpunkt ZT16 in der PT festgestellt wird (Aizawa et al., 2007). Lange Zeit war unbekannt, dass auch der TSH-Rezeptor (TSHR) in der PT vorkommt. Jedoch wurde kürzlich bei der japanischen Wachtel (*Coturnix japonica*) (Nakao et al., 2008b) und auch beim Schaf (Hanon et al., 2008) gezeigt, dass der *Tshr* sowohl in der PT als auch in der Ependymschicht des III. Ventrikels (EC) exprimiert wird. Es wird derzeit angenommen, dass TSH die Typ 2 Deiodinase- (*Dio2*) -Expression stimuliert, die in der EC die

Umsetzung von Tetraiodthyronin (T₄) zu Triiodthyronin (T₃) katalysiert (Yasuo et al., 2007; Hanon et al., 2008; Nakao et al., 2008a).

Ähnlich wie der SCN zeigt auch die PT einen circadianen Rhythmus der Uhrengensexpression; dadurch werden in diesem Gewebe rhythmische Prozesse gesteuert. Im Gegensatz zum SCN ist der Rhythmus der Uhrengene in der PT jedoch sehr stark abhängig von einem rhythmischen Melatoninsignal (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002a; Jilg et al., 2005).

In der PT der Maus liegt das Maximum der Proteingehalte von PER1, PER2 und CRY1 in der Mitte des subjektiven Tages (CT06), obwohl sich in diesem Gewebe die Maxima der Genexpression von *Per1* und *Cry1* sehr stark unterscheiden (von Gall et al., 2002a, 2005; Jilg et al., 2005). Die *Per1*-Expression erreicht ihr Maximum zu Beginn des subjektiven Tages (CT00). Das Maximum der *Cry1*-Expression liegt hingegen in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Daraus ergibt sich für die PT eine ungewöhnlich große Verzögerung von vierzehn Stunden zwischen den Maxima der *Cry1*-Expression und des CRY1-Proteingehaltes. Im Unterschied dazu entspricht die Verzögerung von sechs bis acht Stunden zwischen *Per1*-Expression und PER1-Proteingehalt der im SCN (Hastings und Follett 2001) und in der Leber (Lee et al., 2001). Die PER-Proteine sind nicht nur wichtig für den Transport, sondern auch für die Stabilisierung nukleärer CRY1-Proteine (Kume et al., 1999; Yagita et al., 2000; Lee et al., 2001; Miyazaki et al., 2001). Daher können CRY-Proteine offenbar nur in Anwesenheit von PER-Proteinen existieren, was die ungewöhnlich große Verzögerung zwischen maximaler *Cry1*-Expression und maximalem CRY1-Proteingehalt erklärt. Das Expressionsprofil von *Cry1* und *Per1* korreliert sehr stark mit dem zeitlichen Verlauf des Melatoninprofils. Melatonin steigt in der Mitte der Nacht an und fällt am Ende der Nacht wieder ab. Diese Korrelation deutet darauf hin, dass

Melatonin die *Cry1*-Expression aktiviert, während es die *Per1*-Expression hemmt.

1.5.1 Wirkung des Melatonins auf die Uhrenexpression in der *Pars tuberalis*

Über die nächtliche Melatoninsynthese und -freisetzung übermittelt die innere Uhr dem Organismus auf neuroendokrinem Weg das Signal Dunkelheit. Dauer und Länge des Melatoninsignals sind proportional zur Länge der Nacht (Reiter 1991; Arendt, 2003). Melatonin stellt somit für alle Zellen und Gewebe, die Melatoninrezeptoren besitzen, ein wichtiges internes Signal der diurnalen und saisonalen Beleuchtungsverhältnisse dar. Beim photoperiodischen Hamster ist die Amplitude der Uhrenexpression in der PT, aber nicht im SCN unter Kurztagbedingungen (KT) erniedrigt (Messenger et al. 1999, 2000, 2001; von Gall et al., 2002a). Bei pinealektomierten Syrischen Hamstern (Messenger et al., 2001) und MT1-defizienten Mäusen (von Gall et al., 2002a) ist die *Per1*-Expression in der PT vollständig aufgehoben (Messenger et al., 2001).

Obwohl alle bisher untersuchten Säugetiere einen circadianen Rhythmus der Melatoninsynthese im Pinealorgan zeigen, gibt es Inzucht-Mäusestämme, die Melatonin-defizient sind und ein morphologisch unterentwickeltes Pinealorgan aufweisen (Brendow und Korf 1998). Diese C57BL-Mäuse haben die Eigenschaft Melatonin zu synthetisieren im Laufe der Zeit aufgrund einer Punktmutation im Geschwindigkeitsbestimmenden Enzym (Arylalkylamin *N*-Acetyltransferase; AANAT) verloren (Ebihara et al., 1986; Roseboom et al., 1998). Hingegen zeigen

Freiland- und C3H-Inzucht-Mäuse ein rhythmisches Melatoninprofil (Ebihara et al., 1986, 1987; Goto et al., 1989, von Gall et al., 2001). Im Gegensatz zu Melatonin-profizienten Mäusen zeigen Melatonin-defiziente Mäuse keine rhythmische *Per1*-Expression in der PT (Sun et al., 1997). Darüber hinaus führt eine Pinealektomie zum Erliegen der rhythmischen Uhrengenenexpression in der PT (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002a). Zudem beeinflusst eine akute Melatoninapplikation die Genexpression in der PT von Ratten sowohl aktivierend als auch hemmend (Dardente et al., 2003a). Eine akute Melatonin-Injektion am Ende des Tages verschiebt das Maximum der *Cry1*-Expression nach vorne; und eine akute Injektion mit Melatonin am Ende der Nacht führt zu einer verminderten *Per1*-Expression (Dardente et al., 2003a).

Bei Schafen wurde gezeigt, dass eine kurzzeitige Behandlung adenohipophysärer PT-Schnittkulturen mit Forskolin zu einer Erhöhung der *Per1*-Expression nach zwei Stunden führt (Morgan et al., 1998, 2000). Dabei wirkt Melatonin hemmend auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation in der PT, hat aber keinen Einfluss auf die basale cAMP-Konzentration (Morgan et al., 1998; Dardente 2007). Melatonin hemmt somit die cAMP-Signaltransduktionskaskade in der PT über den MT1-Rezeptor (McNully et al., 1996). In anderen Geweben wirkt Melatonin ebenfalls hemmend auf cAMP-unabhängige-Signalwege (Godson und Reppert 1997; Brydon et al., 1999; Kopp et al., 1999). Allerdings führte eine Eliminierung des Melatoninsignals durch Pinealektomie bei Hamstern überraschenderweise nicht zu einer Desinhibierung, sondern vielmehr zu einer deutlichen Reduktion der Menge an *Per1*-Transkript in der PT (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002a).

Dieser paradoxe Melatoneffekt kann durch den sog. Sensitivierungseffekt erklärt werden. *In vitro* Experimente zeigten einen gesteigerten Effekt des Melatonins auf die Akkumulation von cAMP in PT-

Zellen des Schafes nach unphysiologischer Forskolinstimulation. Diese Steigerung wurde nur beobachtet, wenn die PT-Zellen vor der Stimulation für mehrere Stunden (6-16 Stunden) mit Melatonin vorbehandelt wurden (Hazlerigg et al., 1993). Bei pinealektomierten Mäusen wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet. Interessanterweise können einzelne oder wiederholte Melatonin-Applikationen den Rhythmus der *Per1*-Expression nicht wieder herstellen, wenn die Pinealektomie einige Zeit zurück liegt (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002a). Nur eine Melatonin-Injektion, welche direkt in der nächsten Nacht nach dem Eingriff erfolgte, war in der Lage, die rhythmische Expression von *Per1* in der PT von pinealektomierten-Tieren aufrechtzuerhalten (von Gall et al., 2002a). Folglich führt ein langfristiges Fehlen des Melatoninsignals zum Verlust der Empfindlichkeit der PT gegenüber diesem Hormon, d.h. zur Desensitivierung (von Gall et al., 2002a).

Als eine Substanz, die zur Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsweges in der PT führt, wurde Adenosin identifiziert (von Gall et al., 2002a). Die PT verfügt über eine hohe Dichte des G_s -Protein gekoppelten A_{2b} -Rezeptor (Stehle et al., 1992). In PT-Schnittkulturen der Maus bewirkt NECA (5'-*N*-Ethylcarboxamidoadenosin), ein A_{2b} -Rezeptoragonist eine Akkumulation von cAMP und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB. Eine Präinkubation der PT-Schnittkulturen mit Melatonin führte zu einer deutlichen Potenzierung des Effektes von NECA auf den PER1-Gehalt (von Gall et al., 2002a). Melatonin scheint also, ähnlich wie oben für Forskolin beschrieben, auch den Adenosin-induzierten cAMP-Signaltransduktionsweg über die Adenylatzyklase (AC) zu sensitivieren. Dadurch ergibt sich folgendes Modell: Bei Nacht hemmt Melatonin die cAMP-Signaltransduktionskaskade und sensitiviert gleichzeitig den A_{2b} -Rezeptor. In den frühen Morgenstunden, mit sinkendem Melatoningehalt, entfällt der hemmende

Effekt auf die cAMP-Signaltransduktionskaskade in den PT-Zellen, und Adenosin bewirkt durch Aktivierung des sensitivierten A_{2b}-Rezeptors eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Daraus resultiert eine Phosphorylierung von CREB, welches daraufhin an die CRE-Region (*Ca²⁺/cAMP responsive element*) anderer, durch cAMP-induzierbarer-Gene, wie beispielsweise *Per1* oder *Icer* (*inducible cAMP early repressor*) bindet. Im Laufe des Tages kommt es zur Desensitivierung des A_{2b}-Rezeptors, worauf die cAMP-Konzentration abfällt. Mit Zunahme der Plasma-Melatoninkonzentration während der Nacht startet ein neuer Zyklus (von Gall et al., 2002, 2003).

In der PT von MT1ko-Mäusen ist nicht nur die Expression von *Per1* und *Cry1* verändert, sondern auch von den positiven Regulatoren *Clock* und *Bmal1*, was zu einer deutlichen Reduktion der entsprechenden Proteingehalte führt (von Gall et al., 2005; Jilg et al., 2005). Im Gegensatz dazu werden sowohl *Per2*- als auch *Cry2*-Transkripte durch die Deletion des MT1-Rezeptors nicht beeinträchtigt (Jilg et al., 2005).

Obwohl es bei der MT1ko-Maus eine deutliche Korrelation zwischen reduzierter Uhrengenenexpression in der PT und gesteigerter Prolaktinsynthese in der PD gibt, ist bislang noch unbekannt, ob es eine direkt Verbindung zwischen dem molekularen Uhrwerk und Tuberalin gibt. Das Mausmodell der MT1ko-Maus erscheint ein wertvoller Organismus, um eine solche Verbindung aufzuspüren.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Melatonin ist eine wichtige rhythmische Signalsubstanz des circadianan Systems. Die Aktivierung des Melatoninrezeptors1a (MT1) führt in der *Pars tuberalis* (PT) zur tages- und jahreszeitlichen Veränderungen der Hormonsekretion. Diese Prozesse werden über rhythmische genexpressive Vorgänge gesteuert. Auch im Gehirn dienen Melatoninrezeptoren vermutlich der Dekodierung circadianer Zeitmuster.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, zu untersuchen, wie sich das Fehlen des Melatoninrezeptors1a (MT1ko) oder des transkriptionellen Repressors Period1 (PER1ko) auf die rhythmische Genexpression in der PT und verschiedenen anderen Hirnarealen auswirkt. Als Versuchstiere dienten MT1-defiziente- und PER1-defiziente-Mäuse sowie die dazu gehörigen Melatonin-profizienten-Kontrolltiere (WT).

Zunächst wurde eine vergleichende Mikroarray-Analyse mit PT-Zellen zu einem Nachtzeitpunkt (CT18) mit hohem Melatonin-Serumspiegel und einem Tagzeitpunkt (CT06) mit niedrigem Melatonin-Serumspiegel in der Zirkulation durchgeführt, um Gene zu identifizieren, deren Expression Tag/Nacht Unterschiede im WT, aber nicht in der MT1ko-Maus zeigen. Dadurch wurde bereits eine Gruppe von potenziell Melatonin- und PER1 regulierten Gene eingegrenzt. Bei der weiteren Analyse mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung wurden aus dieser Gruppe solche Gene ausgewählt, die in Zusammenhang mit endokrinen Prozessen stehen oder Rückschlüsse auf mögliche Signaltransduktionswege erlauben. Ein aktueller Effekt des Melatonins auf die Genexpression wurde durch Applikation von exogenem Melatonin am Tage überprüft. Neben der PT wurden auch diencephale und hippocampale Hirnareale untersucht, um neue Erkenntnisse über die Rolle des Melatonins bei der Steuerung vegetativer und kognitiver Funktionen zu gewinnen.

2 Material und Methoden

Darstellung, der in diesem Kapitel verwendeten chemischen Abkürzungen:

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Hämalaun	Mayer's Hämatoxin-Lösung
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PGK-Neo-Kassette	Phosphoglycerinkinase-Neomycin-Kassette
Sakrosyl	N-Laurylsarcosine-Natriumsalz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan

Alle Feinchemikalien und gebrauchsfertigen-Lösungen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Schnellendorf) in p.a.-Qualität bezogen. Enzyme und DNA-Standards wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Darüber hinaus wurden zur Vermeidung einer RNase-Kontamination alle Lösungen und Puffer mit 0,1% DEPC vorbehandelt und autoklaviert.

2.1 Versuchstiere

Sämtliche im Rahmen der Arbeit durchgeführten Tierexperimente entsprachen den Richtlinien für Tierversuche nach der Maßgabe der Europäischen Union (Direktive 86/609/EEC). Es lag eine Genehmigung der genehmigungspflichtigen Tierversuche vor.

Die Versuche wurden mit adulten, sieben bis sechzehn Wochen alten, männlichen Melatoninrezeptor1a-defizienten (MT1ko) (Liu et al., 1997), Period1-Protein defizienten- (PER1ko) Mäusen (Bae et al., 2001) und den dazugehörigen Wildtypen durchgeführt. Die Tiere waren für mindestens 10 Generationen auf einen Melatonin-profizienten Stamm (C3H/HeN Inzucht-Stamm; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) rückgekreuzt. Die Melatonin-Profizienz wurde mittels eines spezifischen Melatonin-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) von Homogenaten nächtlicher Pinealorgane überprüft (nicht gezeigt).

2.1.1 Haltung

Die Versuchstiere wurden bei konstanter Raumtemperatur von 20°C, Futter und Wasser *ad libitum* und unter Beleuchtungsverhältnissen von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit gehalten. Vor Versuchsbeginn waren alle Tiere für zwei Wochen an diese standardisierten Bedingungen adaptiert, so dass eine komplette zeitliche Synchronisation aller Organe der Tiere gewährleistet war. Es folgte ein Zyklus unter Dauer-Dunkel-Bedingungen (DD), wodurch der Einfluss von Licht wegfällt und circadiane Rhythmen untersucht werden können. Daher beziehen sich die in den nachfolgenden Kapiteln verwendeten Zeitangaben, soweit nicht anders

angegeben, auf die subjektiven Lichtverhältnisse (*circadian time*; CT) der Tiere. CT12 ist dabei definiert als Beginn der Aktivitätsphase der Tiere (subjektive Nacht).

2.1.2 Manipulation der Versuchstiere

Um den Einfluss von exogenem Melatonin auf die Genexpression zu untersuchen, erhielten Wildtyp-Mäuse (C3H; n = 4) eine intraperitoneale Melatonin-Injektion (1 mg/kg Körpergewicht in 100 µl 0,5% Ethanol). Als Kontrolle diente eine Injektion mit 100 µl der 0,5% Ethanol-Lösung.

Die Applikation erfolgte in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) und die Gewebeentnahme 2,5 (CT8,5) bzw. 4,5 h (CT10,5) später. Darüber hinaus wurden auch serielle Melatonin- bzw. Vehikel-Injektionen, an drei aufeinanderfolgenden Tagen zum Zeitpunkt CT06 durchgeführt und die Gewebeproben am letzten Tag zum Zeitpunkt CT10,5 entnommen. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.1.3 Genotypisierung

Der Genotyp der genetisch manipulierten Mäuse wurde mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) und MT1- und PER1-spezifischen-Primern überprüft. Die zu erwartenden PCR-Produkt lagen bei 480 bp (MT1-Wildtypallel) und 240 bp (MT1ko-Allel) bzw. bei 400 bp (PER1-Wildtypallel) und 300 bp (PER1ko-Allel).

Schwanzbiopsien (ca. 0,5-1 cm) wurden entnommen und auf Trockeneis gefroren. Zur Lyse wurden die Biopsien mit je 250 µl DirectPCR-Lysis Reagenz (Fa. Peqlab, Erlangen), komplettiert mit 0,3 mg/ml ProteinaseK, versetzt. Es folgte eine Inkubation der Proben bis zur vollständigen Lyse (ca. 4 h bei 55°C). Nachdem die festen Bestandteile in einer Heraeus Biofuge pico (Fa. Kendro, Osterode) 10 s bei 13.000 rpm zentrifugiert waren, erfolgte eine PCR im Thermocycler (Fa. Biorad, CA, USA) mit 2 µl Lysat, 1 µl Desoxyribonukleotid-Mix (10 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl PCR-Puffer, 0,5 µl Taq-Polymerase, 3 µl Primermix (je 15 µM, *sense*-, *antisense*- und PGK-Neo-Kassetten-Primer) und 37 µl Wasser für die Dauer von 35 Zyklen (jeweils ein Zyklus bei 94°C für 30 s, 60°C für 30 s und 72°C für 1 min). Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt mit einem DNA-Farbmarker (0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol, 40% Glycerol) gemischt und mit einem DNA-Standard auf ein 1% Agarosegel bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

PGK-Neo-Kassetten-Primer, der MT1- und PER1-Genotypisierung:

5'-CCA GCT CAT TCC TCC ACT CAT GAT CTA-3'

MT1-Primer (*sense*):

5'-GAG TCC AAG TTG CTG GGC AGT GGA-3'

MT1-Primer (*antisense*):

5'-GAA GTT TTC TCA GTG TCC CGC AAT GG-3'

PER1-Primer (*sense*):

5'-ATT AGT CAG CCC TCA GAG ACA GGC GTC-3'

PER1-Primer (*antisense*):

5'-TGA GTC CTT GCC ATT GCC AGA AGA GG-3'

2.2 Gewebeentnahme

Die Gewebeentnahme fand ausschließlich unter Rotlicht statt, da Rotlicht der Wellenlänge $> 620\text{ nm}$ mit einer Beleuchtungsstärke $< 5\text{ }\mu\text{W/cm}^2$ keinen Einfluss auf Licht-sensitive Parameter des photoneuroendokrinen Systems hat.

Frisches Gewebe wurde direkt nach der Dekapitation der Tiere entnommen. Nach Öffnung der Schädeldecke wurde das Gehirn mit anhängender Hypophyse präpariert, in gekühltem 2-Methylbutan (-20°C) schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Um fixiertes Gewebe zu erhalten, wurden die Tiere perfundiert. Die Narkose erfolgte interperitoneal mit $0,5\text{ g Chloralhydrat/kg Körpergewicht}$ und nachfolgend wurden die Tiere transkardial mit 4% PFA, gelöst in PBS, perfundiert. Unmittelbar vor der Fixierung wurde zur Vermeidung einer intravasalen Blutgerinnung Heparin (2.000 U/Maus in $0,9\%$ physiologischer Kochsalzlösung; Fa. Ratiopharm, Ulm) in den linken Herzventrikel injiziert und $0,9\%$ Kochsalzlösung in den Blutkreislauf geleitet. Zum Abfluss des venösen Bluts wurde das rechte Herzohr geöffnet. Um Gefrierartefakte zu reduzieren, wurde das Gewebe im Anschluss mit 20% Saccharose (gelöst in PBS) kryoprotektiert.

2.3 Gefrierschnittherstellung

Vor der Gefrierschnitt-Herstellung wurden die Objektträger (Super Frost Plus; Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) mit Vektabond (Fa. Linaris, Wertheim) beschichtet, um ein Ablösen der Gewebeschnitte von den Objektträgern zu verhindern. Hierfür wurden die Objektträger je 5 min in

Aceton, Vektabond-Aceton-Gemisch (1:50) und DEPC-behandeltem Wasser inkubiert und getrocknet.

Von den Gehirnen wurden koronale-Gefrierschnitt-Serien (14 μm) und von den Hypophysen transversale-Gefrierschnitt-Serien (20 μm) am Kryostat (Microm HM 500 M, Fa. Microm, Walldorf) bei -20°C angefertigt, die bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert wurden.

2.4 Lasermikrodissektion

Koronale-Gefrierschnitte (14 μm) der PT von MT1ko- und den dazugehörigen Wildtyp-Mäusen von je zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (CT06 und CT18) wurden direkt auf PET-beschichtete Objektträger (Fa. Leica/MicroDissect, Mittenaar) gebracht. Zur histologischen Unterscheidung des Gewebes unter dem Lasermikrodissektion- (LMD) Mikroskop wurde eine Toluidinblau-Färbung durchgeführt, die färbt die Zellkerne blau an (Abb. 4).



Abb. 4: Toluidinblau-gefärbte PT der Maus vor und nach Lasermikrodissektion (LMD).

A) Koronaler-Gewebeschnitt auf einem speziellen-LMD-Objektträger vor der LMD.

B) Teilweise mit dem Laser ausgeschnittene PT-Region

C) Gewebeschnitt nach der LMD, ohne Dissektat. Maßstab: 50 μm .

Zunächst wurden die Gefrierschnitte auf den Objektträgern für 1 min in eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert, daraufhin für 3 min auf einer Heizplatte bei ca. 40°C getrocknet und für 1 min mit einer sterilfiltrierten (Sterilfilter: 0,2 µm Porenweite; Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) 1% Toluidinblau-Lösung gefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit DEPC-behandeltem Wasser entfernt und die Färbung daraufhin mit 75% Ethanol fixiert. Nach dem Trocknen (10 min bei ca. 40°C) wurden die Objektträger unter dem LMD-Mikroskop (Leica AS; Fa. Leica, Wetzlar) positioniert und die PT mit einem gepulsten- (ultravioletten) Laserstrahl ausgeschnitten (Abb. 4). Die Dissektate mit der Trägermembran wurden im Deckel eines 0,2 ml Eppendorfgefäßes aufgefangen, der mit 30 µl einer 4 M Guanidinimthiocyanat-Lösung, komplettiert mit β-Mercaptoethanol (1:100), befüllt war. Nach der LMD wurden die Zellen durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen in einem 100% Ethanol/Trockeneis-Gemisch homogenisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.1 Analyse der Dissektate

Um genügend Gesamt-RNA bei der nachfolgenden Mikroarray-Hybridisierung (10-1.000 ng) zur Verfügung zu haben, wurden die PT-Dissektate von sechs Tieren zu einer Probe vereint. Aus dieser Probe wurde unter Zuhilfenahme des RNeasy Micro Kits (Fa. Qiagen, Hilden) und anschließend DNase I Verdau die Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Danach wurde die Integrität der Gesamt-RNA mit Hilfe eines Bioanalyzer 2.100 Systems (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) überprüft. Hierfür wurde ein RNA-Chip (RNA 6.000 Pico Labchip; Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) mit den dazu gehörigen Chemikalien verwendet und die Durchführung nach Angaben des

Herstellers vorgenommen. Prinzipiell wird bei dieser Methode eine Kapillarelektrophorese in einem kompakten Chipsystem durchgeführt. Mit Hilfe des integrierten Fluoreszenzfarbstoffs und dem Vergleich mit einem internen Standard wird sowohl die Qualität als auch die Quantität der Gesamt-RNA bestimmt. In der nachfolgenden Mikroarray-Analyse wurde ausschließlich nicht-degradierte Gesamt-RNA eingesetzt.

2.5 Mikroarray-Hybridisierung

Die Durchführung der Mikroarray-Hybridisierung auf Mouse430_2-Biochipchips (Fa. Affymetrix, CA, USA) mit 45.501 Transkripten erfolgte durch das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik in Regensburg. Als Qualitätskontrollen wurden neben einer visuellen Beurteilung Hybridisierungskontrollen mitgeführt, die innerhalb eines bekannten Standardmusters mit spezifischen-Sequenzen des verwendeten Chips reagierten. Nach Auslesen der Daten unter Zuhilfenahme der Software Affymetrix GCOS 1.2 (Fa. Affymetrix, CA, USA) erfolgte die weiterführende Analyse der Rohdaten mit dem Programm Microsoft Access (Fa. Microsoft, WA, USA).

2.6 *In situ*-Hybridisierung

Die Verwendung von radioaktiv-markierten Oligonukleotid-DNA-Sonden, deren Basenfolge komplementär zum gesuchten mRNA-Transkript ist, ermöglicht die spezifische Lokalisierung und Quantifizierung von mRNA im Gewebeschnitt (*in situ*). Voraussetzung dafür ist, dass die

RNA bei Nagetieren ungekühlt mindestens 12 h *post mortem* stabil ist und in ihrer natürlichen Lage verbleibt (Ross et al., 1992).

2.6.1 Radioaktiv-markierte ^{33}P -Oligonukleotidsonden

Es wurden 45-mer Oligonukleotide (2 pmol/ μl) radioaktiv mit ^{33}P - α -dATP (250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; Fa. PerkinElmer, Rodgau) markiert, unter Verwendung einer terminalen Deoxynucleotidyl Transferase und dem dazugehörigen Puffer. Nach 2 h Inkubationszeit bei 37°C wurde die enzymatische Reaktion mit 80 μl Puffer (10 mM Tris/pH 8, 1 mM EDTA/pH 8, 200 mM NaCl) gestoppt.

2.6.2 Aufreinigung radioaktiv-markierter Sonden

Die Aufreinigung der ^{33}P - α -dATP-Oligonukleotidsonden erfolgte über Sephadex G-50 (Fa. GE Healthcare, Uppsala, Schweden) Säulen. Hierzu wurde eine 1 ml Einwegspritze (Fa. Kendall, Neustadt) mit Glaswolle (Fa. Assistent, Sondheim) bis zur 0,05 ml Markierung gefüllt und in ein 15 ml Plastikröhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) gestellt. Danach wurde die Spritze vollständig und bis zur Polymerisierung mit 2% Sephadex, gelöst in einem Tris/EDTA/NaCl-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl), gefüllt. Überschüssiger Puffer wurde für 90 s bei 2.000 rpm zentrifugiert und verworfen. Zum Auffangen der radioaktiver-Sonde wurde ein mit 1 μl 0,1 M DTT gefülltes Eppendorfgefäß ohne Deckel in das 15 ml Plastikröhrchen gesteckt und die Sonde auf die Sephadex-Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (90 s, 2.000 rpm) wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (2500 TR; Fa.

Packard, CA, USA) bestimmt. Die Sonden wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert oder bei einer Radioaktivität von $< 100.000 \text{ counts per minute (cpm)}$ verworfen.

2.6.3 Oligonukleotide

Die im Rahmen der Arbeit zur Herstellung von ^{33}P - α -ATP-Oligonukleotidsonden verwendeten 45-mer Oligonukleotide (Fa. MWG, Ebersberg) sind in Tabelle 1 und 2 wiedergegeben.

Die *antisense*-Sequenz diente als Matrize für die *sense*-Sequenz. Um die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals zu verstärken und eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden bei zwei Genen mehrere Sonden vereinigt (Tab. 1).

Name	Sequenz
<i>Npas4</i> -AS1	5'-CGC GCC TTG GAG GCG CCC TTG GTG GAT CGG TAC ATG ACT GCC GGC-3'
<i>Npas4</i> -AS2	5'-GCT CGC TCA CAC TCT CCG ACA GGT ATA GCA ACT TCC CCT CAG CTG-3'
<i>Npas4</i> -AS3	5'-GGG CAT GGT GAG CTG CTG GCG CAC AGT GAG ATG GTC AGC AGG GTC-3'
Riken 7530404M11-AS1	5'-AGC TCC ACC CTG ACA GGT CCG GGA GCA CCT TAC ACT CCT CTC CCA-3'
Riken 7530404M11-AS2	5'-CCA TCT GAC ACC ACC ACT TCT GCA GGA CGA TGG AGG CGT CCA CGC-3'
Riken 7530404M11-AS3	5'-GGC TTT GCT CTG GTG GTG CCA GCC ACC TGG CCG GCA AGG CAG GAG-3'

Tab. 1: Auflistung der vereinigten 45-mer Maus-Oligonukleotide für ^{33}P -Oligonukleotidsonden.

Name	Sequenz
<i>Cry1-AS</i>	5'-CGC GCC CAG CGT CCG GAG GAC ACG CAT ACC TTC CAG GGC CTG AGA-3'
<i>Dio2-AS</i>	5'-TGC TTG AGC AGA ATG ACC GAG TCA TAG AGC GCC AGG AAG AGG CAG-3'
<i>Dbp-AS</i>	5'-GGG TCC ACA GGA CTG GGT GTG TCC CAT GAT GTC AAG CCT GCG CGG-3'
<i>Esr-AS</i>	5'-CCT TTC GGG GAG CCT GGG AGC TCT CAG ATC GTG TTG GGG AAG CCC-3'
<i>Fshb-AS</i>	5'-TGT AGA GGG AGT CTG AGT GGC GGG CAC AGC CAG GCA ATC TTA CGG-3'
<i>Lhb-AS</i>	5'-TGC GAA CGC AAG CTC CCG GTA GGT GCA CAC TGG CTG AGG CAC AGG-3'
<i>Neurod1-AS</i>	5'-ACC GGG AAG GAA GCG CTG GCG GTT GGC AGA TGC GGG GGC ATG TCC-3'
<i>Pomc1-AS</i>	5'-CTC CAT GGA GTA GGA GCG CTT GCC CTC GCG TGG ACT CGG CTC TGG-3'
<i>Tim-AS</i>	5'-GCT GCT GGC CAC GGT GAA CGA GAT GGA CAT GTG CCC AGA TGA GGC-3'
<i>Tshb-AS</i>	5'-GCA CGG AGA GGA GGA CGG CAG CAC TCA TGC TTT GAA CAA CCC GAG-3'
<i>Tshr-AS</i>	5'-TTG TCC CCA CAC ACC GTG TAG TCA TAG TGG CTC TCG AAG GCT TGG-3'

Tab. 2: Auflistung der einzeln verwendeten 45-mer Maus-Oligonukleotide für ^{33}P -Oligonukleotidsonden.

2.6.4 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden die Gefrierschnitte mit 4% PFA 10 min fixiert, in PBS gespült, 20 min mit 0,2% Glyzin gewaschen und 10 min mit 0,1 M Triethanolamin/pH8 und 0,25% Essigsäureanhydrid behandelt. Danach wurden die Schnitte jeweils 5 min in 2x SSC/0,1% Sakrosyl (Waschpuffer) (300 mM NaCl, 300 mM Natriumcitrat) und 0,1x Waschpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100%) entwässert. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese mit 60 µl Hybridisierungspuffer (HP) (50% deionisiertes-Formamid, Tris-HCl/pH 8, 2 mg/ml Hefe-tRNA, 50x Denhardts-Lösung, 5 M NaCl, 10% SDS, 0,5 M EDTA/pH 8, 0,1% Dextransulfat) und 6×10^5 cpm/100 µl HP radioaktiv-markierter Sonde überschichtet, mit Parafilm bedeckt und bei 42°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Parafilm mit 2x Waschpuffer entfernt, die Schnitte erneut bei 55°C gewaschen (30 min in 2x Waschpuffer; 2x 40 min in 0,1x Waschpuffer), entwässert und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 14-32 Tage gegen einen Röntgenfilm (Kodak BioMax MR, Fa. Sigma, Eching) exponiert; dabei führen die emittierten Elektronen des Radioisotops durch Reduktion der Silberionen zur Schwärzung des Films. Ein ^{14}C -Standard (Fa. GE Healthcare Biosciences, NJ, USA) wurde in jeder Filmkassette mitgeführt, um zu überprüfen, ob die Hybridisierungssignale im linearen Bereich des Films lagen.

2.6.5 Entwicklung autoradiographischer Filme

Die Entwicklung der autoradiographischen-Filme erfolgte in einer Dunkelkammer unter Rotlicht. Sie wurden jeweils 2 min in Entwicklerlösung (1:25) (Rodinal; Fa. Agfaphoto, Leverkusen), Wasser, Fixierlösung (1:8) (Fa. Tetenal; Norderstedt) und in Wasser getaucht und anschließend getrocknet.

2.7 Stimulation hypothalamischer Schnittpräparate

Um eine Phasenverschiebung der inneren Uhr durch die Schnittpräparation zu vermeiden (Gillette 1986), wurden die Tiere während der Hellphase zwischen ZT01 und ZT03 getötet. Die Zeitgeber-Zeit (ZT00) entspricht dem Beginn der Hellphase, ZT12 dem Beginn der Dunkelphase. Der Zeitpunkt der Stimulation wird als ZT des Spendertiers definiert.

Die frisch entnommenen Gehirne wurden in Opti-MEM-Medium (Fa. Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) überführt und an einem Vibratom (Fa. WPI/Campden Instruments, Sileby, UK) in 500 µm dicke koronale Hirnschnitte zerlegt. Unter dem Dissektionsmikroskop wurde die Hypothalamus/PT Region mit einem Skalpell herausgeschnitten. Jeweils 5 Schnittpräparate wurden zusammen in 1 ml Medium im CO₂-Inkubator für 2 h bei 37°C präinkubiert. Nachfolgend wurden die Präparate zwischen ZT03 und ZT05 für die Dauer von 4 h mit 100 µU/ml TSH oder dem entsprechenden Vehikel (Wasser) als Kontrolle stimuliert. Nach erfolgter Stimulation wurden die Schnittkulturen über Nacht in 4% PFA immersionsfixiert, in 20% Saccharose kryoprotektiert und am Kryostat in

14 µm dicke Gefrierschnitte zerlegt, die zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert wurden.

2.8 Hormonkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Tetraiodthyronin (T4) im Kulturüberstand von stimulierten bzw. unstimulierten Proben wurde in der Endokrinologie des Klinikums der Goethe Universität mit einem vollautomatisierten Immunoassaysystem (Centaur; Fa. Siemens, Frankfurt) nach der direkten Chemiluminieszenz-Methode bestimmt.

2.9 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Identifizierung der radioaktiv-markierten Strukturen wurden die Gewebeschnitte nach der *in situ*-Hybridisierung einer Hämalaun-Eosin-Färbung unterzogen.

Bei der Hämalaun-Eosin-Färbung werden alle basophilen Zellbestandteile, wie das Chromatin der Zellkerne, durch Hämalaun blau und alle azidophilen Zellbestandteile, wie das Zytoplasma, durch Eosin rot angefärbt. Zunächst wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten 10 min in Hämalaunlösung gefärbt, mindestens 10 min unter fließendem Wasser differenziert und anschließend 2 min in Eosin gegengefärbt. Nach Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100%) und Xylol wurden diese mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckelt.

2.10 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie bietet die Möglichkeit, in Gewebeschnitten Proteine oder Peptide (Antigene) spezifisch nachzuweisen und zu lokalisieren. Die Intensität der Färbung kann unter bestimmten Bedingungen mit der Konzentration der Antigene korrelieren.

Die Gewebeschnitte der perfundierten Gehirne wurden zusätzlich für 2 min in 70% Ethanol fixiert. Die endogene Peroxidasenaktivität wurde mit 0,5% H_2O_2 in Methanol für 10 min blockiert. Nach kurzem Spülen in Ethanol und dreimaligem Waschen in PBS/0,3% Triton wurden die Schnitte zur Reduktion des Hintergrundsignals 1 h bei Raumtemperatur mit normalem Ziegen-Serum behandelt (1:20 in 0,01 M PBS + 1% BSA + 0,3% Triton) und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in 0,01 M PBS + 1% BSA + 0,3% Triton inkubiert. Als Primärantikörper dienten anti-pCREB (1:500; Fa. Cell Signaling/New England Biolabs; Frankfurt) und anti-TSHb (1:300; Nationales Hormon und Peptid Programm, Dr. Parlow, USA), beide aus Kaninchen stammen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x mit Waschpuffer (10 mM PBS, 0,3% BSA, 0,1% Triton) gewaschen und für 1 h mit dem Zweitantikörper (Biotin-konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege; 1:600) inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die Schnitte 1 h mit Meerrettich-peroxidase-gekoppeltem Extravidin (1:100 in Waschpuffer) behandelt und nicht gebundenes Extravidin durch Waschen mit Waschpuffer entfernt. Danach wurden sie in 0,05 M Tris-Puffer äquillibriert; die Farbreaktion wurde mit 0,05% DAB/0,01% H_2O_2 in 0,05M Tris-Puffer durchgeführt. Nach Stoppen der Farbreaktion mit Tris-Puffer und kurzem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Präparate mit Kaiser's Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

2.11 Densitometrische Analyse

Alle Autoradiographien wurden in einen Flachbettscanner (Epson Perfection V750-M Pro, Fa. Epson, Nagano, Japan) eingelesen. Die Daten wurden mit einer Auflösung von 1200 dpi und 8 bits (Grauwerte von 0 – 255) digitalisiert und später mit dem Bildanalysesystem NIH ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) bearbeitet. Die Intensität der spezifischen Signale der Autoradiographien wurde in der Graustufenskala von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) gemessen und unter Berücksichtigung des mitgeführten ^{14}C -Standards auf die radioaktive Intensität (nCi) umgerechnet. Pro Versuchsgruppe wurden von mindestens 3 Tieren jeweils 3 Gewebeschnitte randomisiert ausgewählt, in denen mit Hilfe des NIH ImageJ Programms die Signalstärke sowie die Signalgröße erfasst und die relative Größe und Intensität eines Signals durch Summation der entsprechenden Graustufen quantifiziert wurde. Die Werte wurden gemittelt und gegen das entsprechende Hintergrundsignal korrigiert. Alle Werte wurden als relative Intensität der mRNA-Transkripte angegeben. Zur besseren graphischen Darstellung wurden die Abbildungen in dieser Arbeit mit der Auto-Tonwertkorrektur des PhotoshopCS-Programms (Fa. Adobe Systems, San Jose, CA, USA) nachbearbeitet.

Die Digitalisierung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte an einem VIDAS-Bildanalysesystem (KS 300; Fa. Kontron, Eichingen), bestehend aus einem Axioplan-Mikroskop (Fa. Zeiss, Göttingen) sowie einem digitalen Bildwandler (Fa. AVT Horn, Aalen). Die Zuordnung der immunreaktiven Strukturen sowie der quantitative Vergleich der Strukturen untereinander erfolgte an einem konventionellen Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Göttingen) im Abgleich mit dem Allen-Reference-Atlas des zentralen Nervensystems der Maus (Fa. Wiley-VCH, Weinheim).

Die Intensität der spezifischen Immunreaktion in der PT wurde anhand der Graustufenskala von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) gemessen, gemittelt und gegen das entsprechende Hintergrundsignal korrigiert. Alle gemittelten Werte wurden als relative optische Dichte (O.D.) angegeben.

2.12 Statistik

Die statistische Analyse der Messdaten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Fa. GraphPad, San Diego, CA, USA) unter Verwendung einer einfaktoriellen-ANOVA-Varianzanalyse (*one-way analysis of variance*), die einen unabhängigen Vergleich von mehr als zwei Gruppen zulässt. Die ANOVA-Varianzanalyse entspricht somit einem t-Test. Danach wurde zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander der Bonferroni Test durchgeführt. Der p-Wert gibt ein Maß der Wahrscheinlichkeit an, dass alle verglichenen Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die graphische Darstellung erfolgte als relative, mittlere Intensität mit Angaben der Standardabweichung und des Signifikanzniveaus (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Differentielle Genexpression in der *Pars tuberalis* von WT und MT1ko-Mäusen

Der Effekt des Melatonins auf die Uhrengenexpression in der PT wird über den Melatoninrezeptor1a (MT1) vermittelt (von Gall et al., 2002, 2005; Jilg et al., 2005). Um die Rolle des Melatonins bei der Regulation genexpressiver Vorgänge in der PT zu untersuchen, wurden Melatonin-profiziente (WT) mit Melatoninrezeptor1a-defizienten (MT1ko) Mäusen mit Hilfe der Mikroarray-Technologie verglichen. Zuvor wurde unter Zuhilfenahme der Lasermikrodissektion (LMD) die Gesamt-RNA aus PT-Zellen von jeweils sechs Tieren eines Genotyps gesammelt und als eine Probe aufbereitet. Die Probenahme erfolgte zu zwei Zeitpunkten: zur Mitte der subjektiven Nacht (CT18) mit hohen Serum-Melatoninspiegeln und Mitte des subjektiven Tages (CT06) mit geringer Serum-Melatoninspiegeln (von Gall et al., 2001).

3.1.1 Integrität der Gesamt-RNA

Die gewonnene Gesamt-RNA der vereinten LMD-Dissektate von WT- und MT1ko-Mäusen zu den Zeitpunkten CT06 und CT18 wurde vor der Mikroarray-Analyse auf Integrität getestet und quantifiziert.

Das Elektropherogramm der Gesamt-RNA aus der Integritätsmessung zeigte bei allen vier Proben zwei signifikant erhöhte Ausschläge der 18S- und 28S-rRNA auf (Abb. 5). Das 28S/18S Intensitätsverhältnis lag zwischen 1,8 und 2,1. Dies belegt, dass die Gesamt-RNA nicht degradiert war. Unabhängig vom Zeitpunkt der Probenahme lag die Ausbeute der

Gesamt-RNA von den MT1ko-Proben (30 ng) geringfügig unter der des Wildtyps (36 ng).

Das Ergebnis der Integritätsmessung zeigt, dass die Lasermikrodissektion eine geeignete Methode zur RNA-Isolierung aus Gewebeschnitten darstellt.

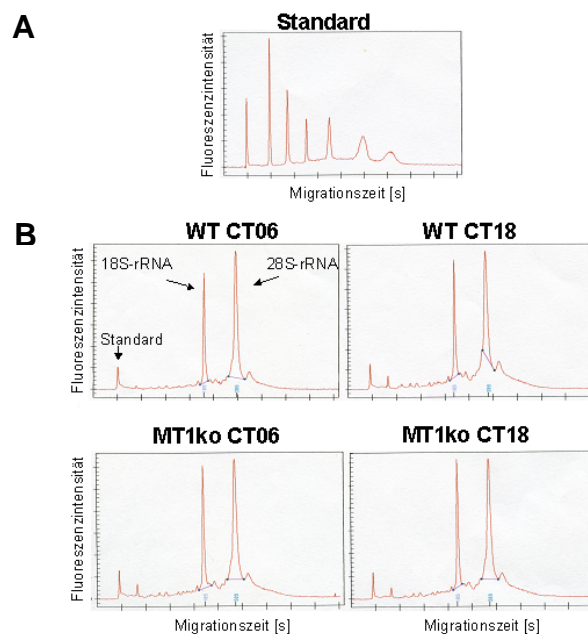


Abb. 5: Integritätsbestimmung mit Hilfe des Bioanalyzers 2100 der Gesamt-RNA aus WT- und MT1ko-Dissektaten der PT.

A) Elektropherogramm des Standards ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität des in die RNA interkalierten Farbstoffs gegen die Migrationszeit in der Agarose-ähnlichen-Matrix des Bioanalyser-RNA-Chips.

B) Elektropherogramme der analysierten WT- und MT1ko-Proben zu den Zeitpunkten CT06 und CT18. Der erste Ausschlag entspricht dem Standard und die beiden deutlich höheren und späteren Ausschläge der 18S- und 28S-rRNA.

3.1.2 Mikroarray-Analyse

Die mit Hilfe der Lasermikrodissektion gewonnene Gesamt-RNA der PT von WT- und MT1ko-Mäusen wurde in einer vergleichenden Mikroarray-Analyse mit 45.501 Transkripten je Biochip eingesetzt.

Diese Analyse ergab zunächst, dass in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) beim WT 1570 Gene signifikant stärker und 1174 Gene schwächer exprimiert waren als bei der MT1ko-Maus (Abb. 6). Hingegen wurden in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) beim WT im Vergleich zur MT1ko-Maus nur 979 Gene aktiviert und 650 Gene inhibiert. Zu beiden Zeitpunkten war die Genexpression beim WT im Vergleich zur MT1ko-Maus um das anderthalbfache induziert.

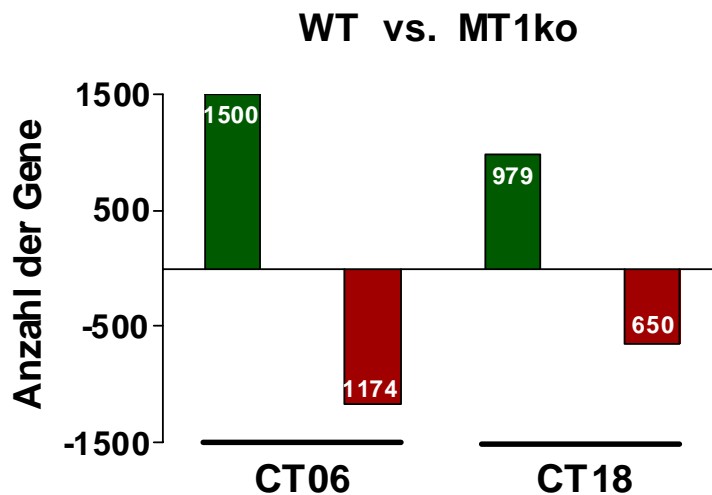


Abb. 6: Vergleichende Genexpression von WT- mit MT1ko-Mäusen zu den Zeitpunkten CT06 und CT18.

Gesamtzahl der Gene, die im WT bei CT06 oder CT18 im Vergleich zur MT1ko-Maus in der PT herauf (grün) oder herab (rot) reguliert waren.

Aus der Gruppe der tageszeitlich unterschiedlich exprimierten Gene wurden 8 Gene ermittelt, die bei beiden Genotypen eine deutlich stärkere Genexpression bei Nacht (CT18) als bei Tag (CT06) aufwiesen (Tab. 3). 15 weitere Gene zeigten in beiden Genotypen eine deutlich schwächere Genexpression bei Nacht (CT18) als bei Tag (CT06) (Tab. 4). Das Albumin D-Element-bindende Protein (*Dbp*; Tab. 4) und Proopiomelanocortin1 (*Pomc1*; Tab. 4) zeigten bei der Mikroarray-Analyse die größte Expressionsänderung ($\text{SLR} \geq 3$), weshalb sie zur weiteren Analyse ausgewählt wurden (siehe Kapitel 3.2).

WT CT18 vs. WT CT06	MT1ko CT18 vs. MT1ko CT06	Probe	Name
Immunantwort		1427624_s_at	Il22
Differenzierung und Entwicklung		1425587_a_at	Ptprij
Proteinmodifikation		1456733_x_at	Serpinh1
Apoptose		1449033_at	Tnfrsf11b
Unbekannte Funktion		1424952_at	Ociad1
		1422155_at	Hist2h3c2
		1420347_at	Plunc
		1453397_at	9130016M20Rik
	SLR = 3		
	SLR = 1		

Tab. 3: Liste der 8 Gene, welche in beiden Genotypen in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) im Vergleich zur Mitte des subjektiven Tages (CT06) signifikant herauf (grün) reguliert waren.

Die Änderung der Expression eines Transkripts zwischen Hintergrund und Signalintensität wurde als Single Log Ratio (SLR) dargestellt. Diese Änderung wurde als \log_2 wiedergegeben, so dass ein SLR von 1 einer zweifach erhöhten Expressionsänderung entsprach.

WT CT18 vs. WT CT06	MT1ko CT18 vs. MT1ko CT06	Probe	Name
Uhrengene		1418174_at	Dbp
Hormone		1433800_a_at	Pomc1
		1419325_at	Nmu
Immunantwort		1419691_at	Camp
		1419394_s_at	S100a8
		1419764_at	Chi3l3
Differenzierung und Entwicklung		1419606_a_at	Tnnt1
Elektronentransport		1422230_s_at	Cyp2a4
Metabolismus		1415904_at	Lpl
Translationsregulatoren		1422660_at	Rbm3
Apoptose		1417130_s_at	Angptl4
		1417898_a_at	Gzma
		1426065_a_at	Trib3
Unbekannte Funktion		1448756_at	S100a9
		1428584_a_at	Haghl
	SLR = -1		
	SLR = -3		

Tab. 4: Liste der 15 Gene, welche in beiden Genotypen in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) im Vergleich zur Mitte des subjektiven Tages (CT06) signifikant herab (rot) reguliert waren.

Die Änderung der Expression eines Transkripts zwischen Hintergrund und Signalintensität wurde als Single Log Ratio (SLR) dargestellt. Diese Änderung wurde als log2 wiedergegeben, so dass ein SLR von -1 einer zweifach erniedrigten Expressionsänderung entsprach.

3.1.2.1 Charakterisierung der Gene mit einer Melatonin-abhängigen Expression in der *Pars tuberalis*

Parallel zu den Genen, die einen Tag/Nacht Unterschied in der PT aufwiesen, sollten mit Hilfe der Mikroarray-Analyse weitere Gene identifiziert werden, deren Expression durch Melatonin über den MT1-Rezeptor gesteuert war. Ein bereits identifiziertes Gen, das in der PT durch Melatonin aktiviert wird, ist *Cry1*. Dieses wird zum Zeitpunkt CT18 (erhöhter Melatoninspiegel) maximal exprimiert (von Gall et al., 2005, Jilg et al., 2005), ist bei MT1ko-Mäusen stark reduziert (von Gall et al., 2005, Jilg et al., 2005) und ist am Tag durch exogen appliziertes Melatonin induzierbar (Dardente et al., 2003a).

Um weitere Gene zu identifizieren, deren Expression durch Melatonin (über den MT1-Rezeptor) aktiviert wird, wurden folgende Kriterien festgelegt (Tab. 5): (a) im WT deutlich stärkere Genexpression in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06), (b) in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) deutlich geringere Expression in der MT1ko-Maus als beim WT, (c) keine Tag/Nacht Unterschiede bei der MT1ko-Maus (Tab. 5).

Wie erwartet, entsprach *Cry1* diesen drei Kriterien. Hierdurch wurde die Validität der Mikroarray-Analyse bestätigt (Tab. 7).


Um Gene zu identifizieren, deren Expression durch Melatonin (über den MT1-Rezeptor) gehemmt wird, wurden folgende Kriterien festgelegt (Tab. 5): (a) im WT deutlich schwächere Genexpression in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06), (b) in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) deutlich stärkere Expression in der MT1ko-Maus als beim WT, (c) keine Tag/Nacht Unterschiede bei der MT1ko-Maus (Tab. 5).

Melatonin-aktivierte Genexpression	
WT CT18 vs. WT CT06	↑ herauf reguliert
MT1ko CT18 vs. WT CT18	↓ herab reguliert
MT1ko CT18 vs. MT1ko CT06	↔ gleich
Melatonin-gehemmte Genexpression	
WT CT18 vs. WT CT06	↓ herauf reguliert
MT1ko CT18 vs. WT CT18	↑ herab reguliert
MT1ko CT18 vs. MT1ko CT06	↔ gleich

Tab. 5: Kriterien der Melatonin-abhängigen Genexpression in der PT der Maus.

Die Mikroarray-Analyse ergab, dass 14 Gene den Kriterien der Aktivierung durch Melatonin (ähnliches Expressionsmuster wie *Cry1*) und 13 Gene den Kriterien der Hemmung durch Melatonin (umgekehrtes Expressionsmuster wie *Cry1*) entsprachen. Unter diesen insgesamt 27 Melatonin-regulierten Genen befanden sich 16 Gene mit bekannter Funktion (Tab. 6) und 11 mit derzeit noch unbekannter Funktion (Tab. 7).

Aus diesen Listen wurden 6 Gene zur weiteren Analyse ausgewählt: (a) *Cry1* zur internen Kontrolle, (b) das Uhrenkontrollierte Gen (*clock controlled gene*; ccg) Timeout (*Tim*), (c) Gene mit sehr starker Expressionsänderung (SLR > 3), wie der Transkriptionsfaktor Neurodifferentiation1 (*Neurod1*) und das neuronale PAS Protein4 (*Npas4*), das bisher funktionell noch nicht charakterisiert wurde, (d) Gene, die an endokrinen Prozessen beteiligt sein könnten, wie der Thyroidea-stimulierende Hormonrezeptor (*Tshr*) und das Rikengen 7530404M11Rik (*Tafa3*), das für ein kleines sekretorisches Peptid kodiert.



- SLR = 3
- SLR = 1
- SLR < 1 > -1
- SLR = -1
- SLR = -3

Tab. 7: Liste der 11 Melatonin-regulierten Gene mit unbekannter Funktion.

3.1.2.2 Charakterisierung der Gene, deren Expression in der *Pars tuberalis* durch den negativen Regulatorkomplex gesteuert wird

Neben der Identifizierung von Genen, deren Expression Melatonin abhängig ist, ergab die Auswahl der beiden Zeitpunkte (CT06 und CT18) Hinweise auf Gene, deren Expression in der PT durch den negativen Regulatorkomplex (NRC) gesteuert werden könnte.

Es ist bekannt, dass in der PT von WT-Mäusen die Protein-Spiegel des negativen Regulatorkomplex (PER1, PER2 und CRY1) ihr Maximum in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) erreichen (Jilg et al., 2005) und die Expression ihrer Gene bei MT1ko-Mäusen stark reduziert ist (von Gall et al., 2002a; Jilg et al., 2005; von Gall et al., 2005).

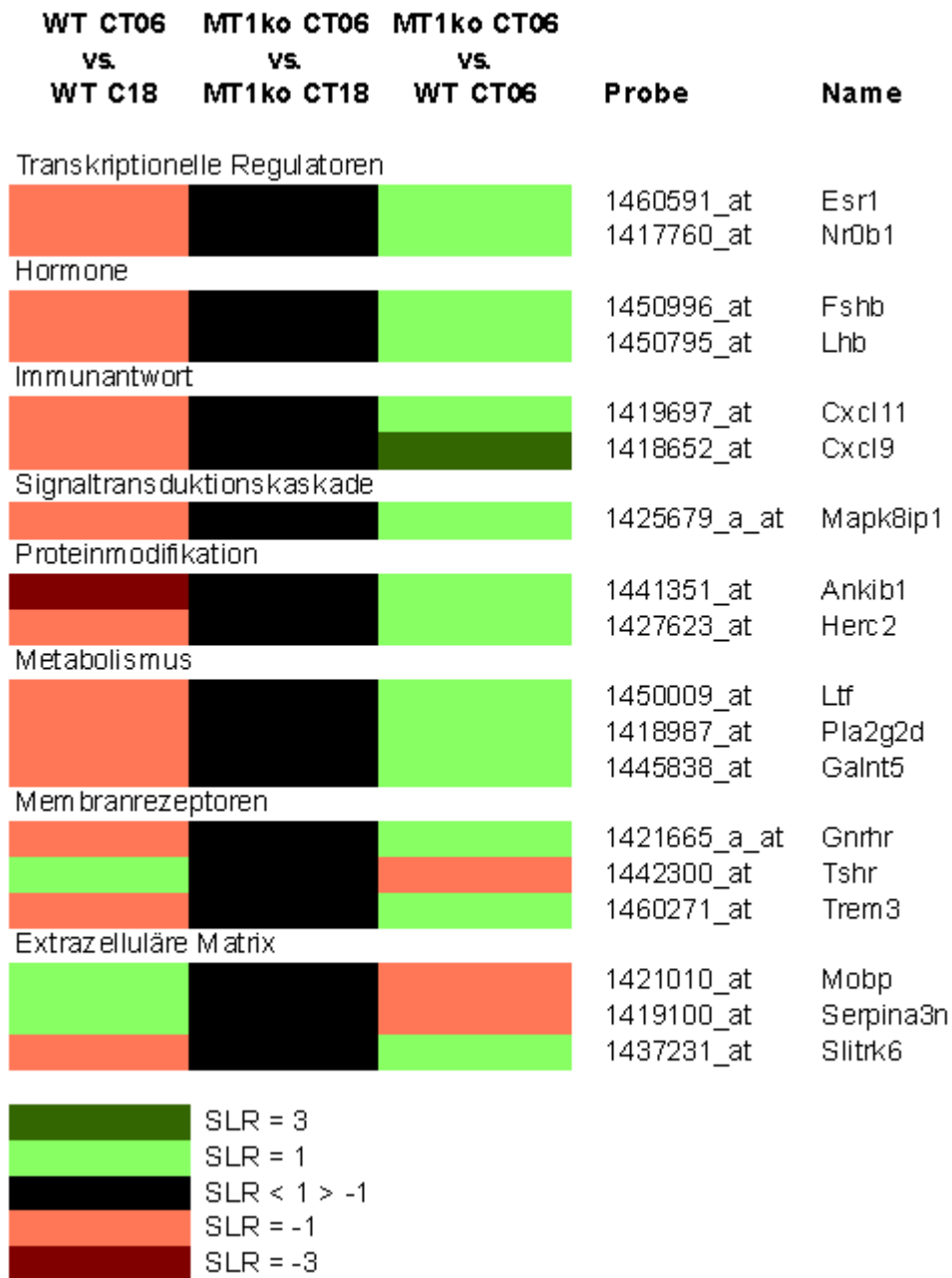
Daher wurden zur Identifizierung von Genen, deren Expression durch den NRC gehemmt wird, die folgenden drei Kriterien festgelegt (Tab. 8). (a) im WT eine deutlich schwächere Genexpression zum Zeitpunkt CT06 als zum Zeitpunkt CT18, (b) zum Zeitpunkt CT06 eine deutlich stärkere Genexpression in der MT1ko-Maus als bei der WT-Maus; (c) keine Tag/Nacht Unterschiede bei der MT1ko-Maus.

Zur Identifizierung von Genen, deren Expression durch den NRC aktiviert wird, wurden folgende Kriterien festgelegt (Tab. 8): (a) im WT eine deutlich schwächere Genexpression zum Zeitpunkt CT06 als zum Zeitpunkt CT18, (b) zum Zeitpunkt CT06 eine deutlich schwächere Genexpression in der MT1ko-Maus als bei der WT-Maus, (c) keine Tag/Nacht Unterschiede bei der MT1ko-Maus.

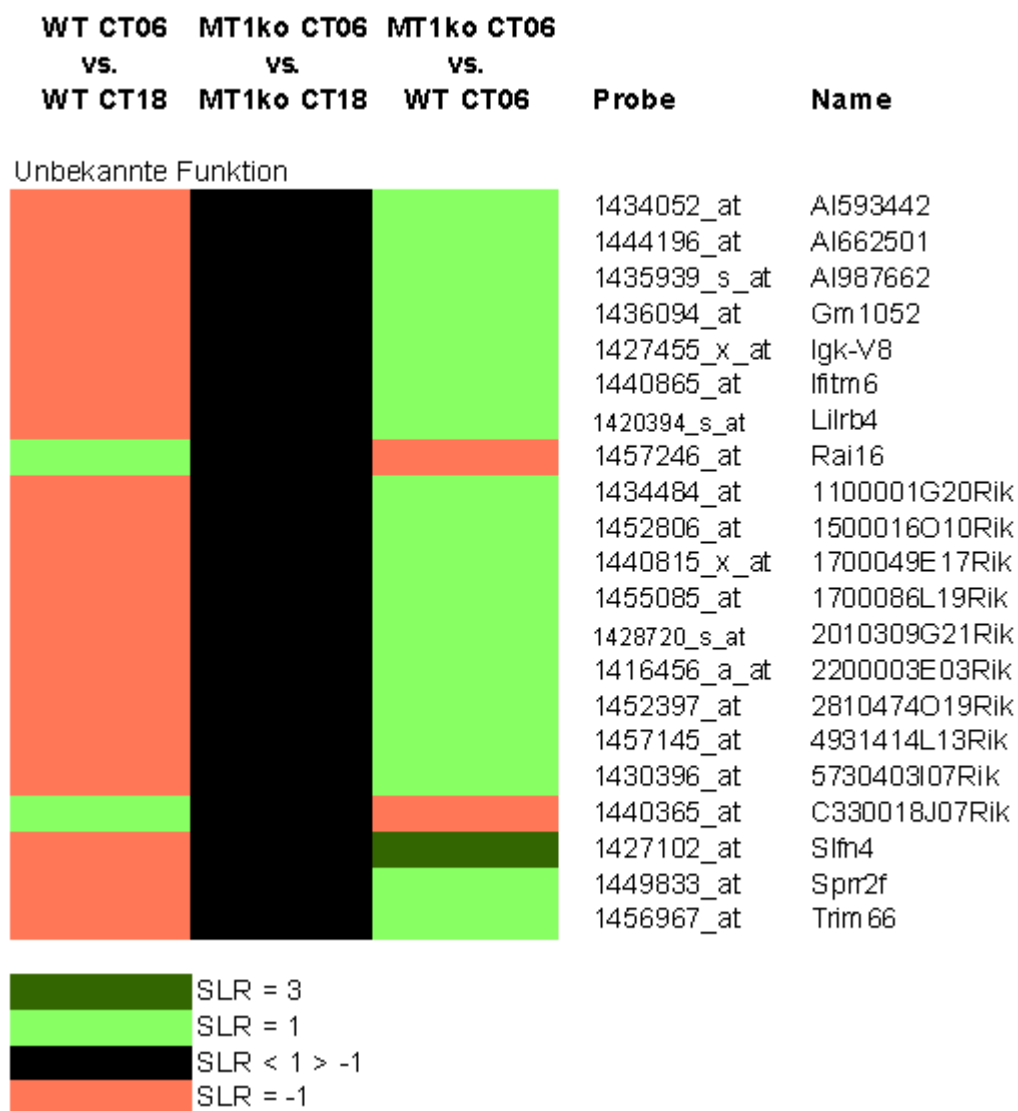
Insgesamt wurden mit Hilfe dieser Kriterien 39 Gene ermittelt, deren Expression durch den NRC reguliert wird (Tab. 9 und 10). Mehr als der Hälfte dieser Gene ließ sich keine Funktion zuordnen (Tab. 10).

NRC-aktivierte Genexpression	
WT CT06 vs. WT CT18	↑ herauf reguliert
MT1ko CT06 vs. WT CT06	↓ herab reguliert
MT1ko CT06 vs. MT1ko CT18	↔ gleich
NRC-gehemmte Genexpression	
WT CT06 vs. WT CT18	↓ herab reguliert
MT1ko CT06 vs. WT CT06	↑ herauf reguliert
MT1ko CT06 vs. MT1ko CT18	↔ gleich

Tab. 8: Kriterien der NRC-abhängigen Genexpression in der PT der Maus.



Tab. 9: Liste der 18 NRC-regulierten Gene mit bekannter Funktion.



Tab. 10: Liste der 21 NRC-regulierten Gene mit unbekannter Funktion.

Aus diesen 39 vermutlich NRC-regulierten Genen wurden 6 für die weitere Analyse ausgewählt, da sie an endokrinen Prozessen beteiligt sein könnten. Hierbei handelt es sich um das follikelstimulierende Hormon beta (*Fshb*) und das luteinisierende Hormon beta (*Lhb*), den Östrogenrezeptor1 (*Esr1*), sowie den Thyroidea-stimulierenden Hormonrezeptor (*Tshr*).

Letzterer gehört auch in die Gruppe von Genen, deren Expression Melatonin abhängig ist.

Insgesamt wurden bei der Analyse der differentiellen Genexpression in der PT von WT- mit MT1ko-Mäusen 63 Gene mit einem Tag/Nacht Unterschied in der WT-Maus identifiziert (Abb. 6, 7, 9, 10). Davon zeigten 24 Gene eine Melatonin- und 36 eine NRC-abhängige Expression. Drei Gene erfüllten sowohl die Kriterien einer Melatonin- als auch einer NRC-abhängigen Expression. Bei diesen drei Genen handelte es sich um den Thyroidea-stimulierten Hormonrezeptor (*Tshr*), den Chemokinen CXC-Ligand9 (*Cxcl9*) und ein Rikengen (2010309G21 Rik).

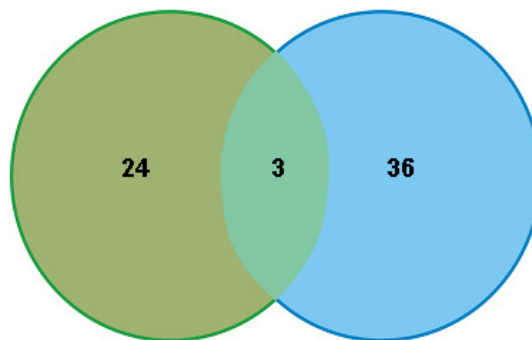


Abb. 7: Venn-Diagramm der Gene mit einem Tag/Nacht Unterschied in der PT der WT-Maus.

Insgesamt wurden 24 Gene identifiziert, deren Expression vermutlich durch Melatonin (grün) und weitere 36 Gene, deren Expression vermutlich durch den NRC (blau) reguliert wird. Drei Gene erfüllten sowohl die Kriterien der Melatonin-abhängigen als auch der NRC-abhängigen Expression.

3.2 Analyse differentiell exprimierter Gene von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung

Eine weitere Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung mit ^{33}P -Oligonukleotidsonden durchgeführt. Von besonderem Interesse waren zwölf Gene, die transkriptionelle Regulatoren, Hormone, Hormonrezeptoren oder Proteine mit unbekannter Funktion kodieren, welche entweder als endokrine (7530404M11Rik/*Tafa3*) oder transkriptionelle (*Npas4*) Regulatoren agieren können. Ferner wurde die Expression der beta-Untereinheit des Thyroidea-stimulierenden Hormons (*Tshb*) untersucht, die bekanntermaßen in der PT exprimiert wird.

Transkriptionelle Regulatoren	Hormone und Hormonrezeptoren	Gene mit unbekannter Funktion
<i>Cry1</i>	<i>Esr1</i>	<i>Npas4</i>
<i>Dbp</i>	<i>Fshb</i>	<i>Tafa3</i>
<i>Neurod1</i>	<i>Lhb</i>	
<i>Pomc1</i>	<i>Tshb</i>	
<i>Tim</i>	<i>Tshr</i>	

Tab. 11: Liste der 12 Gene von besonderem Interesse.

Neben den WT- und MT1ko-Mäusen wurden auch Period-Protein defiziente-Mäuse (PER1ko) mit den entsprechenden Wildtypen untersucht, um den direkten Einfluss des PER1-Proteins und damit des NRC auf die Genexpression zu überprüfen. Aufgrund der Rückkreuzung auf den gleichen genetischen Hintergrund (C3H/J) zeigten MT1ko- und PER1ko-Wildtypen das gleiche Expressionsmuster der untersuchten

Gene (Daten nicht gezeigt) und wurden deshalb als gemeinsame Wildtypgruppe (WT) zusammengefasst.

Die *in situ*-Hybridisierung bestätigte, dass *Cry1*, *Dbp*, *Fshb*, *Lhb*, *Neurod1*, *Npas4*, *Tafa3*, *Tim*, *Tshb*, und *Tshr* in der PT exprimiert wurden und (zumindest) in der PT der WT-Maus einen Tag/Nacht Unterschied aufwiesen.

Darüber hinaus zeigte die *in situ*-Hybridisierung, dass einige der untersuchten Gene nicht nur in der PT, sondern auch in der Ependymschicht des III. Ventrikels exprimiert wurden. Diese Region ist ein wichtiges Steuerungszentrum für die saisonale Regulation der Fortpflanzungstätigkeit (Yasuo et al., 2007) und ist vermutlich auch ein Zielgebiet des von der PT produzierten TSH (Nakao et al., 2008; Hanon et al., 2008).

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung wurde auch ein Tag/Nacht Unterschied in der Expression von *Dbp*, *Npas4*, *Esr1* und *Pomc1* in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen.

Eine Expression von *Esr1* und *Pomc1* war in der PT nicht nachweisbar, zeigte jedoch einen starken Tag/Nacht Unterschied im angrenzenden Hypothalamus, v. a. im *Nucleus arcuatus* (NA).

Um zu überprüfen, ob die Expression dieser Gene im Hypothalamus durch Melatonin gesteuert wird, wurden Melatoninapplikationen am Tag durchgeführt.

3.2.1 Steuerung der Genexpression transkriptioneller Regulatoren

3.2.1.1 Steuerung der *Cry1*-Genexpression

Zunächst wurde die Expression des Uhrengens Cryptochrom1 (*Cry1*) in der PT untersucht. Es ist bekannt, dass *Cry1* in der PT der Maus rhythmisch mit einem Maximum in der Nacht, exprimiert wird, seine Expression durch den MT1-Rezeptor gesteuert (Jilg et al., 2005) und durch Applikation von exogenem Melatonin in der PT der Ratte induziert wird (Dardente et al., 2003a). Daher diene dieses Gen als interne Kontrolle eines Melatonin-aktivierten Gens.

Erwartungsgemäß war beim WT die *Cry1*-Expression in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) (Abb. 8C). Abbildung 8A zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm mit maximaler *Cry1*-Expression in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) in der PT einer WT-Maus. Darüber hinaus war die *Cry1*-Expression in der Nacht bei der MT1ko-Maus deutlich niedriger als beim WT und bei den MT1ko-Mäusen wurde kein signifikanter Tag/Nacht Unterschied beobachtet. Diese Befunde bestätigten eine aktivierende Wirkung des Melatonins auf die *Cry1*-Expression in der PT der Maus.

In den PER1ko-Mäusen entsprach das Muster der *Cry1*-Expression dem des WT (Abb. 8C). Aufgrund des Melatonin-profizienten Hintergrunds war dieses Ergebnis nicht überraschend. Offenbar wird die *Cry1*-Expression in der PT nicht durch eine PER1-Defizienz beeinflusst.

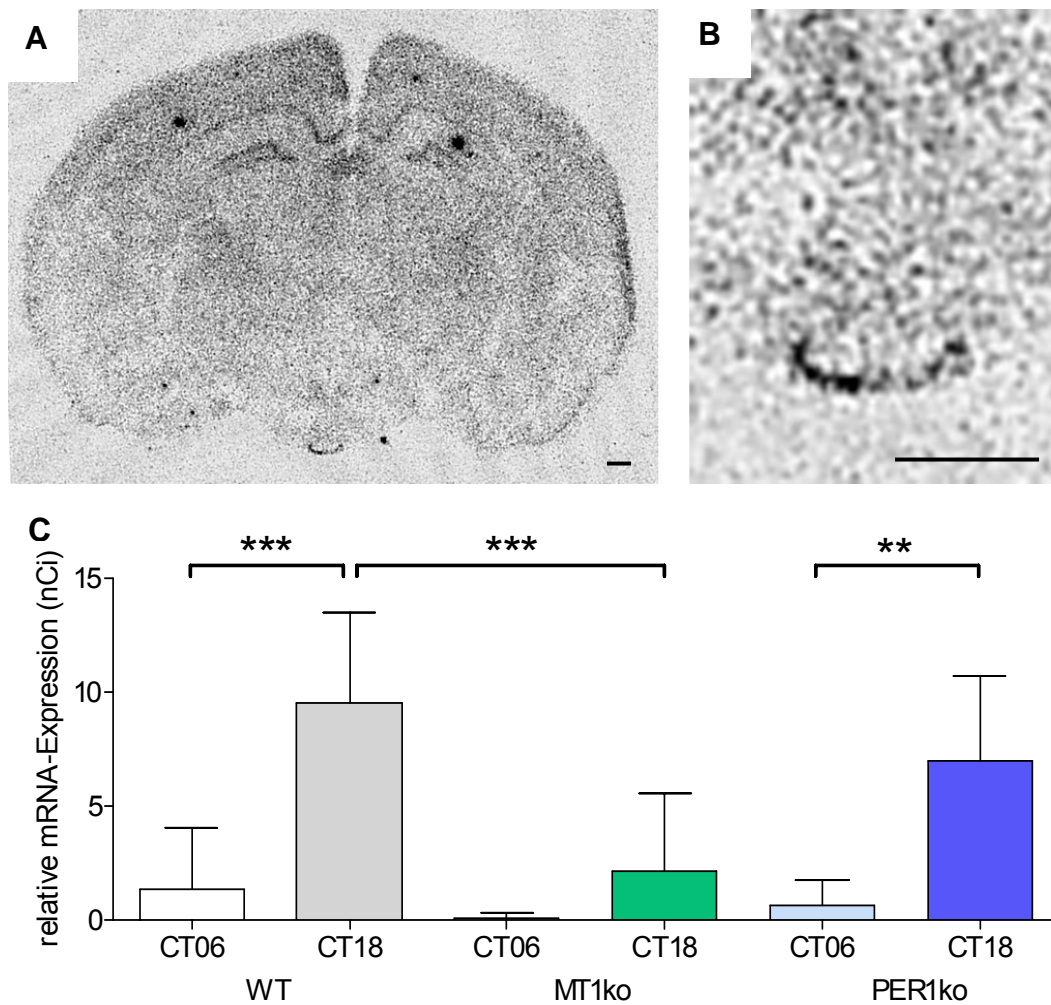


Abb. 8: Expression der *Cry1*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.
 A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Cry1*-Expression in der PT zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m.
 B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m.
 C) Profil der *Cry1*-Expression in der PT. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Cry1*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als am subjektiven Tag (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; **p < 0,01; *** p < 0,001).

Die *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass *Cry1* nicht nur in der PT, sondern auch in der Ependymschicht des III. Ventrikels (EC) exprimiert wird.

Um zu überprüfen, ob die *Cry1*-Expression in der PT der Maus durch Melatonin aktiviert wird, wurde C3H-Mäusen am subjektiven Tag (CT06) exogenes Melatonin (+Mel) oder das entsprechende Vehikel (-Mel) appliziert und die *Cry1*-Expression zwei Stunden nach Behandlung mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung analysiert. Die Applikation von exogenem Melatonin führte nach zwei Stunden (CT8,5) zu einer deutlichen Zunahme der *Cry1*-Expression in der PT, aber nicht in der EC (Abb. 9).

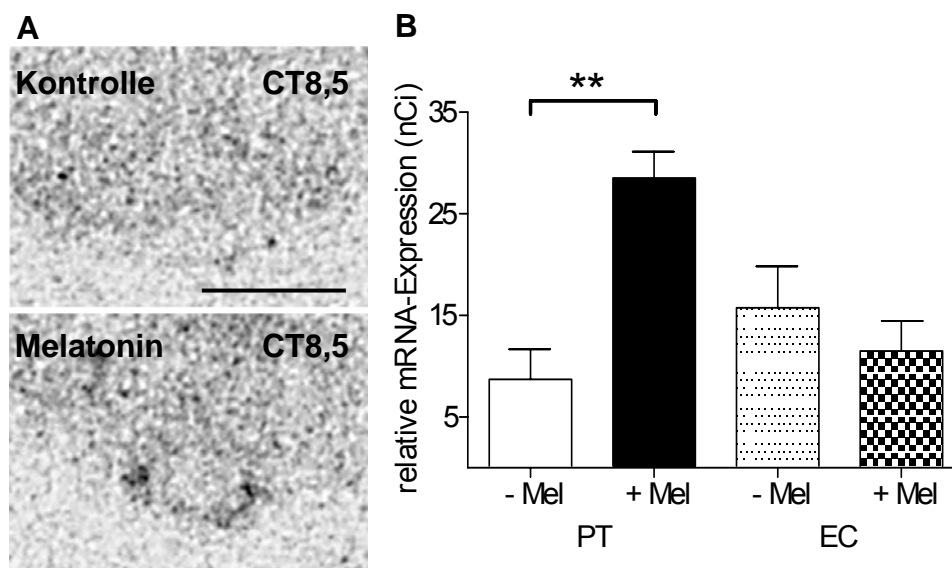


Abb. 9: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Cry1*-Expression im WT bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Cry1*-Expression in der PT. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 µm.

B) Exogenes Melatonin induziert die *Cry1*-Expression nach zwei Stunden in der PT, aber nicht in der EC der WT-Maus (n = 4; **p < 0,01).

Die Befunde bestätigen, dass die *Cry1*-Expression in der PT der Maus durch Melatonin aktiviert wird.

3.2.1.2 Steuerung der *Tim*-Genexpression

Die *in situ*-Hybridisierung bestätigte das Ergebnis der Mikroarray-Analyse (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2.1, Tab. 6), dass *Timeout* (*Tim*) ein entgegengesetztes Expressionsmuster zu *Cry1* in der PT der Maus (zum Vergleich siehe Kapitel 3.2.1.1; Abb. 8) aufweist. *Tim* zeigte im WT und in der PER1ko-Maus eine signifikant niedrigere mRNA-Expression in der subjektiven Nacht (CT18) als am subjektiven Tag (CT06). Demgegenüber war in der MT1ko-Maus sowohl am subjektiven Tag als auch in der subjektiven Nacht ein relativ hoher Gehalt an *Tim*-Transkripten und damit einhergehend kein Tag/Nacht Unterschied zu beobachten (Abb. 10C).

Diese Befunde deuten auf eine hemmende Wirkung des Melatonins auf die *Tim*-Expression in der PT der Maus hin. In den PER1ko-Mäusen wurde ein ähnliches Expressionsmuster wie im WT ermittelt (Abb. 10C), so dass ein Einfluss des molekularen Uhrwerks auf die *Tim*-Expression unwahrscheinlich erscheint.

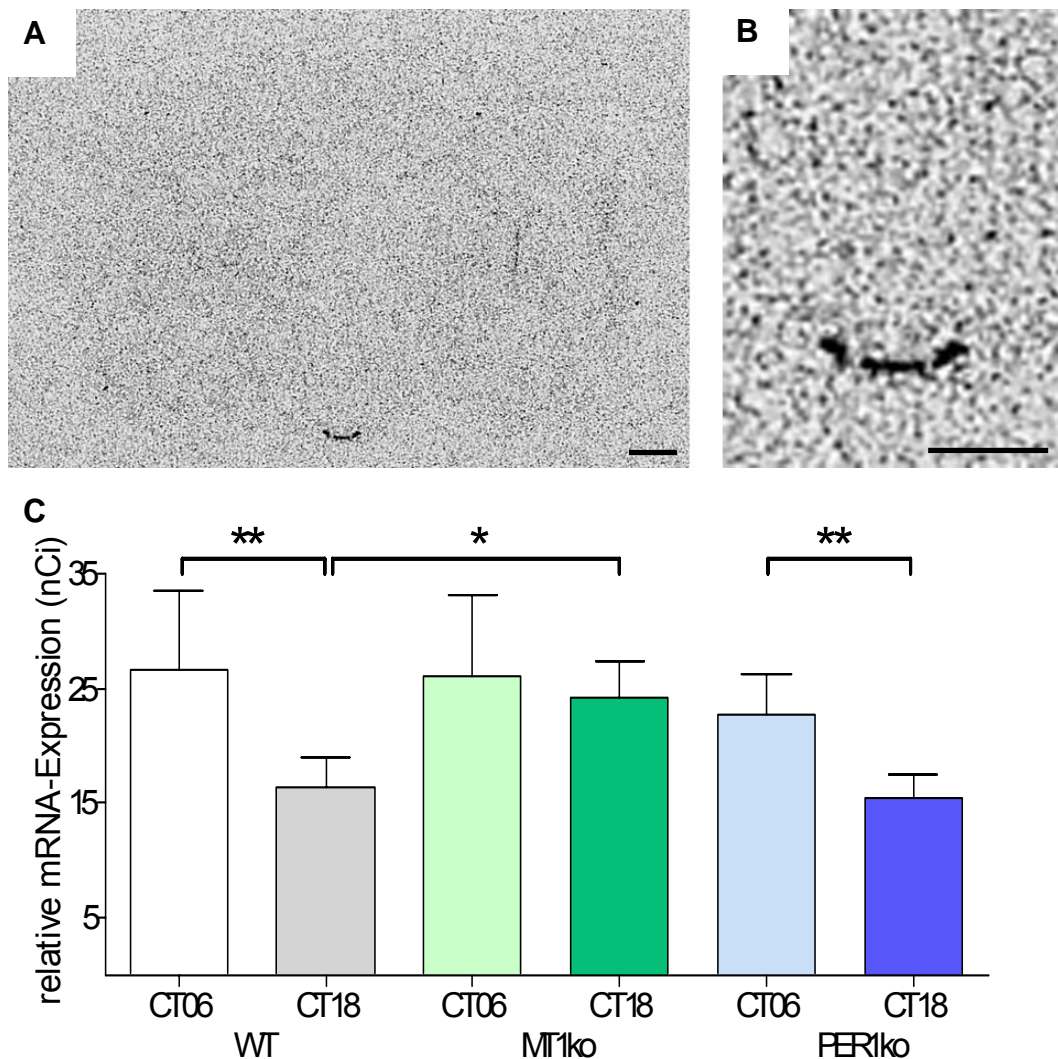


Abb. 10: Expression der *Tim*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Tim*-Expression zum Zeitpunkt CT06. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m.

C) Profil der *Tim*-Expression in der PT. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Tim*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) deutlich höher als in der subjektiven Nacht (CT18). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; *p < 0,05; **p < 0,01).

Die Hypothese, dass die *Tim*-Expression in der PT der Maus durch Melatonin gehemmt wird, wurde durch Behandlung mit exogenem Melatonin überprüft. Tatsächlich führte die exogene Applikation von Melatonin zu einer deutlichen Abnahme an *Tim*-Transkripten in der PT, aber nicht in der EC der Maus (Abb. 11).

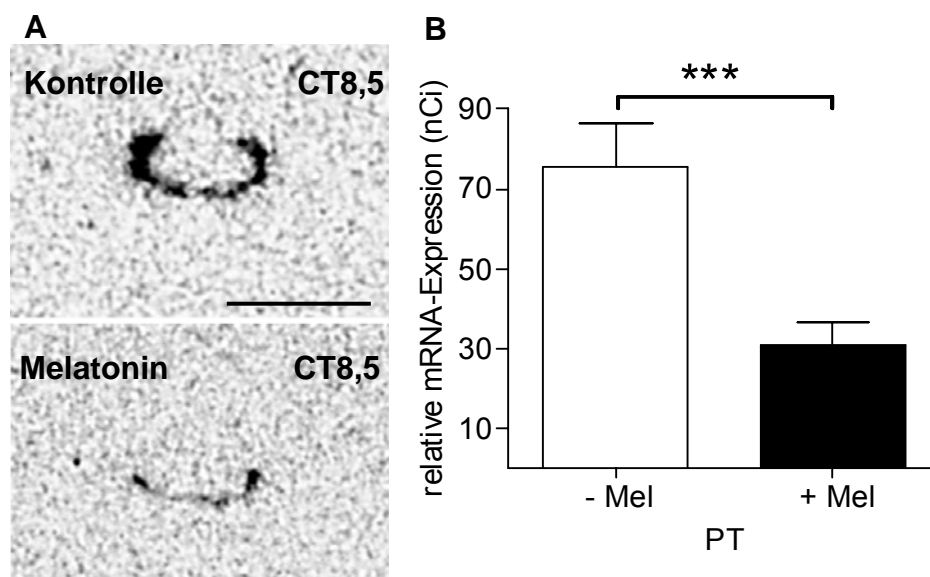


Abb. 11: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Tim*-Expression im WT bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Tim*-Expression in der PT. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 μ m.

B) Exogenes Melatonin hemmt die *Tim*-Expression nach zwei Stunden in der PT der Maus ($n = 4$; *** $p > 0,001$).

3.2.1.3 Steuerung der *Dbp*-Genexpression

Die zeitabhängige *Dbp*-Expression wurde mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung bestätigt (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2, Tab. 4). Wie erwartet zeigte *Dbp* in der PT aller untersuchter Mäusestämme eine deutlich stärkere Expression bei Nacht (CT18) als bei Tag (CT06) (Abb. 12C). Dieser signifikante Tag/Nacht Unterschied deutet auf eine rhytmische Expression in der PT der Maus hin, die unabhängig von Melatonin und NRC abläuft.

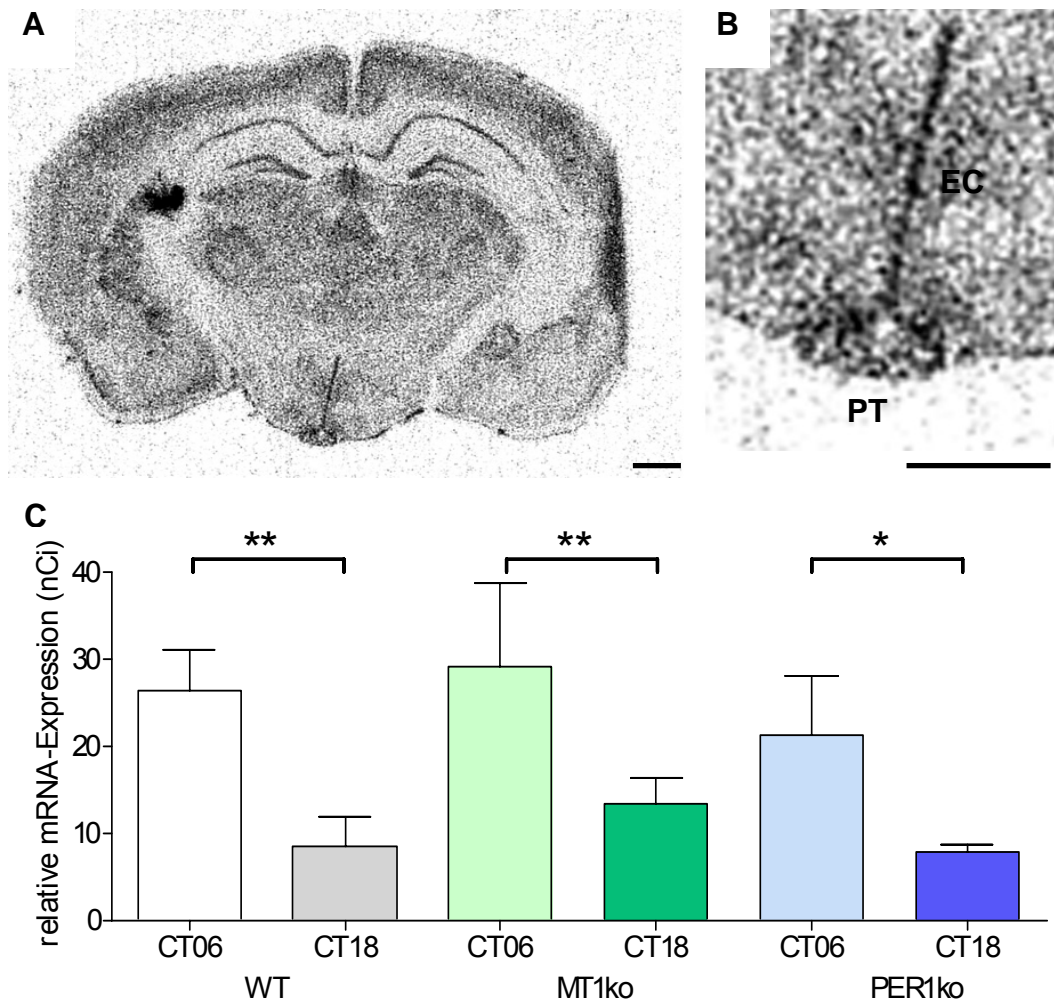


Abb. 12: Expression der *Dbp*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Dbp*-Expression zum Zeitpunkt CT06. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m.

C) Profil der *Dbp*-Expression in der PT. Bei allen Genotypen war die maximale *Dbp*-Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) signifikant höher als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; *p < 0,05, **p < 0,01).

Ein starker Tag/Nacht Unterschied der *Dbp*-Expression war ebenfalls in der EC zu beobachten. Ähnlich wie in der PT war auch hier bei allen Genotypen die *Dbp*-Expression zum Zeitpunkt CT06 stärker als zum Zeitpunkt CT18 (Abb. 13).

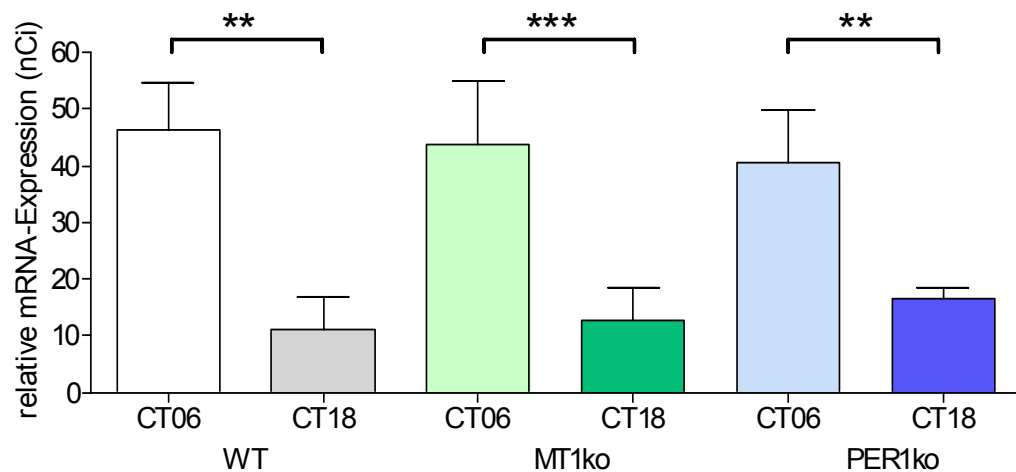


Abb. 13: Expression der *Dbp*-mRNA in der EC von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen. Profil der *Dbp*-Expression in der Ependymschicht (EC). Alle Genotypen zeigten eine maximale *Dbp*-Expression zum Zeitpunkt CT06 im Vergleich zu CT18 (n = 4; **p < 0,01, ***p < 0,001).

Überraschenderweise führte die Gabe von exogenem Melatonin sowohl in der PT als auch in der EC zu einer deutlichen Hemmung der *Dbp*-Expression (Abb. 14).

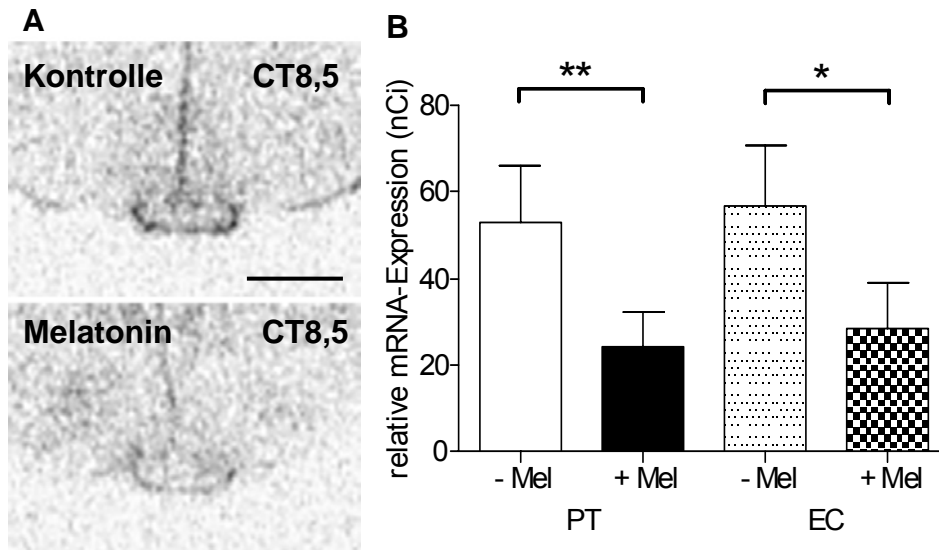


Abb. 14: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Dbp*-Expression im WT bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Dbp*-Expression in der PT und EC der Maus. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 µm.

B) Exogenes Melatonin hemmt die *Dbp*-Expression nach zwei Stunden sowohl in der PT als auch in der EC (n = 4; *p > 0,05; **p > 0,01).

Die *Dbp*-Expression war nicht auf die PT und die EC beschränkt, sondern fand sich auch in weiteren diencephalen Kerngebieten: *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), *Nucleus arcuatus* (NA), *Nucleus dorsomedialis hypothalami* (DMH), *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH), *Nuclei habenulares* (NH) sowie in hippocampalen Hirnarealen: *Cornus ammonis* 1 und 3 (CA1; CA3) und *Gyrus dentatus* (GD; Abb. 15).

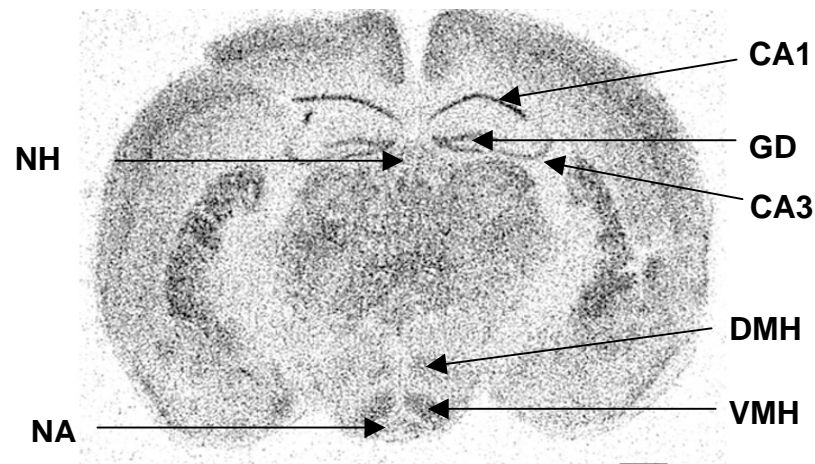


Abb. 15: Expression der *Dbp*-mRNA in posterioren hypothalamischen und hippocampalen Kerngebieten. Koronaler Gewebeschnitt der Maus. [*Nucleus arcuatus* (NA), *Nucleus dorsomedialis hypothalami* (DMH), *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH), *Cornu ammonis*1 und 3 (CA1; CA3), *Gyrus dentatus* (GD), *Nuclei habenulares* (NH)]. Maßstab 350 µm.

Im Diencephalon war ein Tag/Nacht Unterschied lediglich im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN; Abb. 16C) und in den *Nuclei habenulares* (NH; Abb. 17C) nachweisbar.

Zunächst wurde die Expression von *Dbp* im SCN analysiert. Zahlreiche Studien belegen, dass die rhythmische Genexpression von *Dbp* im SCN der Maus von der molekularen Uhr gesteuert wird (Lopez-Molina et al., 1997; Yamaguchi et al., 2000; Ripperger et al., 2006, 2007).

In Abbildung 16A ist das paarige Kerngebiet des SCN im anterioren Hypothalamus einer WT-Maus zur Mitte des subjektiven Tages (CT06) dargestellt. Die *Dbp*-Expression im SCN zeigte einen Tag/Nacht Unterschied mit der gleichen Phasenlage wie in der PT (zum Vergleich siehe Abb. 12C): Der Gehalt an *Dbp*-Transkripten im SCN war bei allen Genotypen in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) deutlich höher als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18).

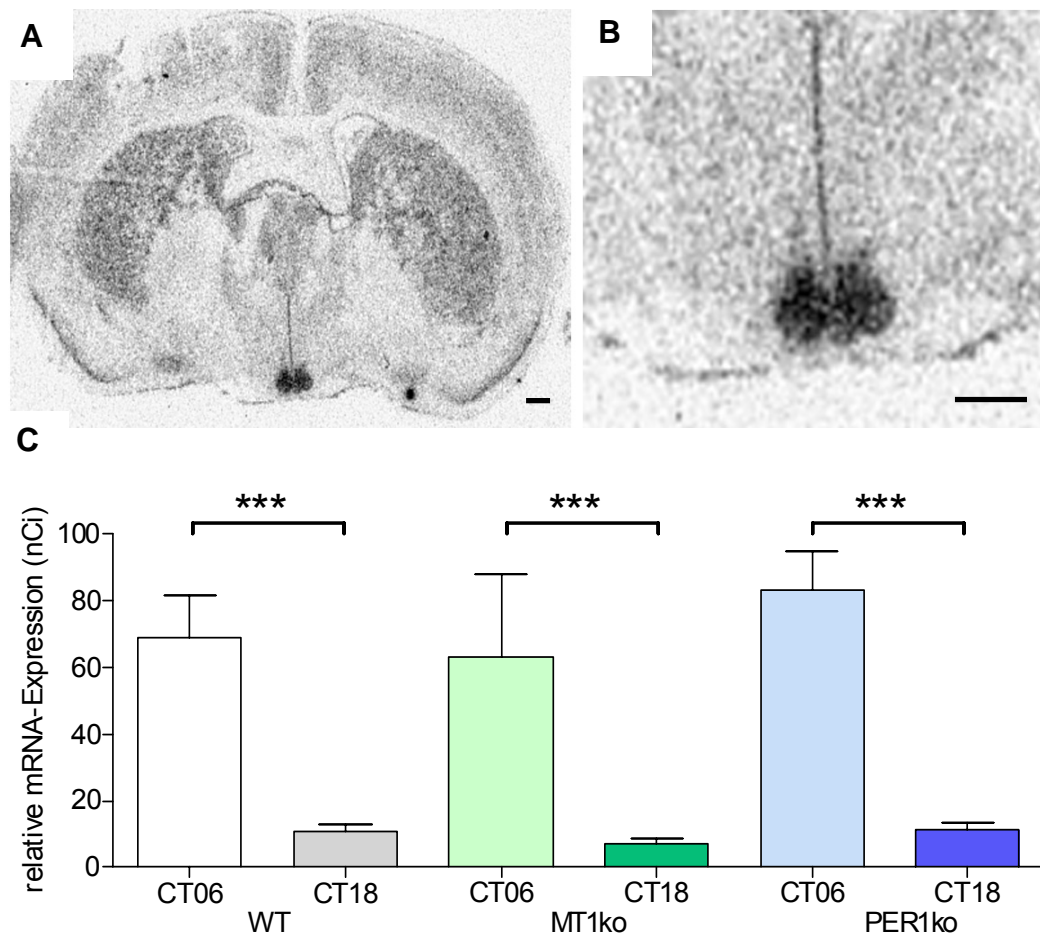


Abb. 16: Expression der *Dbp*-mRNA im SCN von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Dbp*-Expression zum Zeitpunkt CT06. Koronaler Gehirnschnitt einer WT-Maus. Maßstab 500 μ m.

B) Vergrößerung des SCN-Areals. Maßstab 500 μ m.

C) Profil der *Dbp*-Expression im SCN. Bei allen Genotypen war die maximale *Dbp*-Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) signifikant höher als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; *** $p < 0,001$).

Die Abbildung 17A zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm der *Dbp*-Expression im koronalen Gewebeschnitt einer WT-Maus zum Zeitpunkt CT06 und CT18. Bereits mit bloßem Auge ist eine höhere *Dbp*-Expression am Tag (CT06) als in der Nacht (CT18) in der PT, in den hippocampalen Arealen CA2 und GD des Hippocampus und in den NH zu beobachten, während die CA1- und CA3-Region des Hippocampus bei Nacht eine stärkere *Dbp*-Expression aufwiesen.

Die Analyse in den *Nuclei habenulares* (NH) im WT und der PER1ko-Maus zeigt eine stärkere *Dbp*-Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT18) im Vergleich zur Mitte der subjektiven Nacht (CT18). In den NH von MT1Ko-Mäusen war die *Dbp*-Expression am Tag und in der Nacht gleichbleibend hoch (Abb. 17B). Dies könnte auf eine Hemmung der *Dbp*-Expression durch Melatonin in diesem Kerngebiet hinweisen.

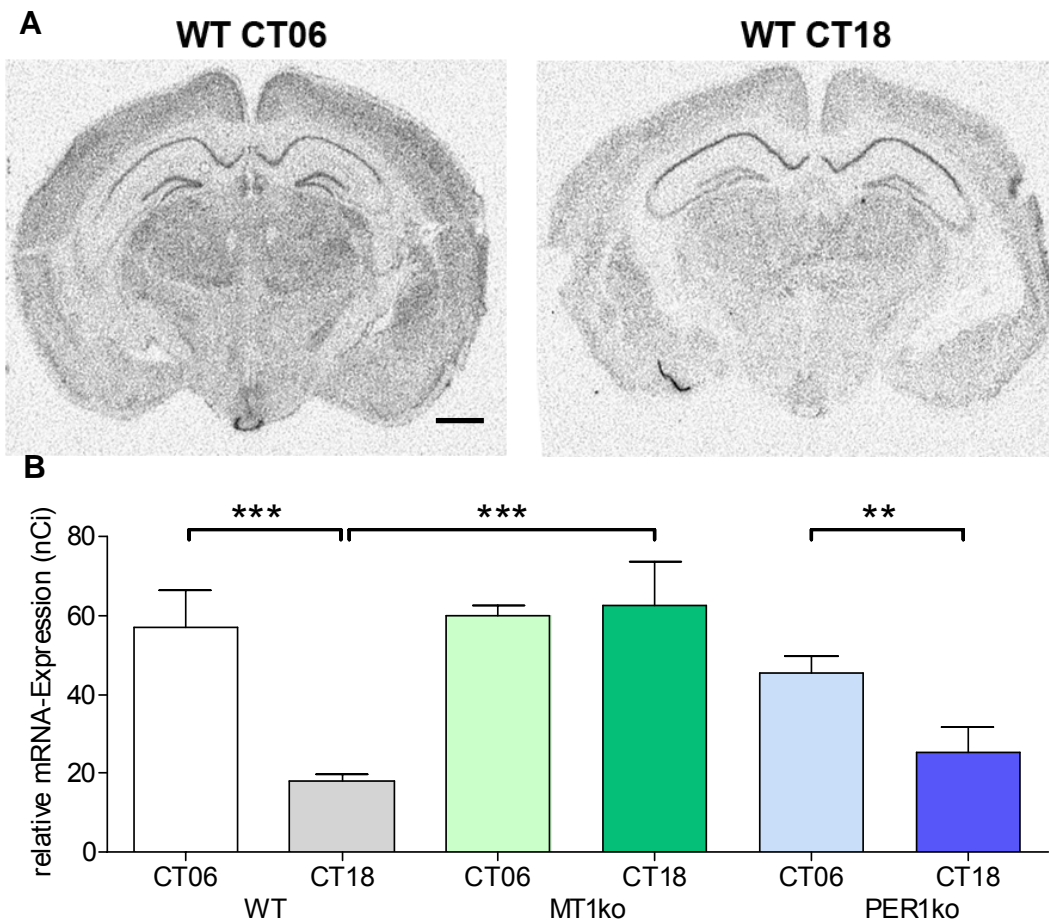


Abb. 17: Expression der *Dbp*-mRNA in den NH von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.
 A) Exemplarische Autoradiogramme der *Dbp*-Expression zum Zeitpunkt CT06 und CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 500 μ m.
 B) Im Gegensatz zur MT1ko-Maus ist die *Dbp*-mRNA beim WT und der PER1ko-Maus in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) deutlich reprimiert. Die *Dbp*-Expression ist in der MT1ko-Maus bei Tag und Nacht hoch. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Die Analysen der hippocampalen Regionen zeigten im *Gyrus dentatus* (GD) ein ähnliches Muster der *Dbp*-Expression wie in den NH: im WT und in der PER1ko-Maus war die *Dbp*-Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) stärker als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Im GD von MT1Ko-Mäusen war die *Dbp*-Expression am Tag und in der Nacht annähernd gleich stark (Abb. 18). Dies könnte auf eine Hemmung der *Dbp*-Expression durch Melatonin hindeuten.

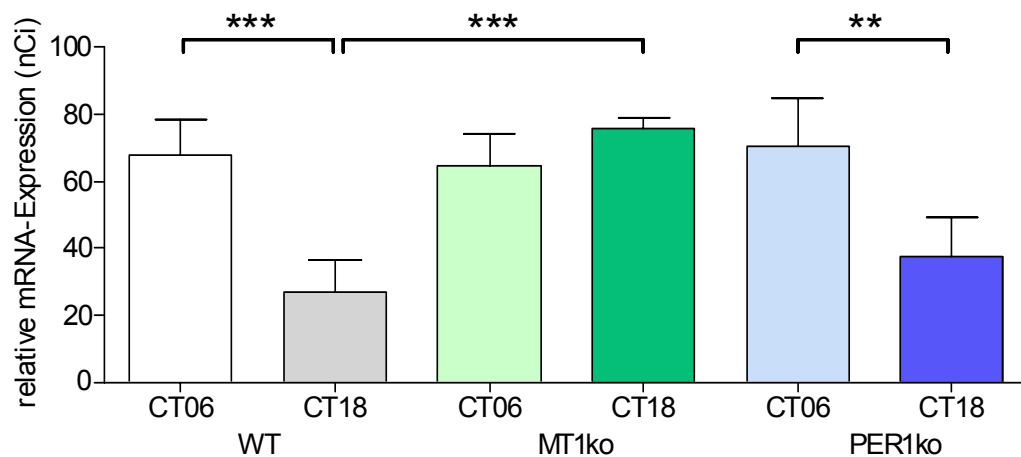


Abb. 18: Expression der *Dbp*-mRNA im GD von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

Im Gegensatz zur MT1ko-Maus wird die *Dbp*-mRNA beim WT und der PER1ko-Maus in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) deutlich reprimiert. Die *Dbp*-Expression ist in der MT1ko-Maus zu CT06 und CT18 gleich hoch. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

Im Gegensatz zu GD und NH fand sich in den CA1- und CA3-Regionen bei allen Genotypen eine deutlich höhere *Dbp*-Expression bei Nacht (CT18) als am Tag (CT06; Abb. 19A und 19B). Demzufolge wird *Dbp* in diesen beiden Regionen ebenfalls rhythmisch, aber mit invertierter Phasenlage zu PT, EC und SCN exprimiert.

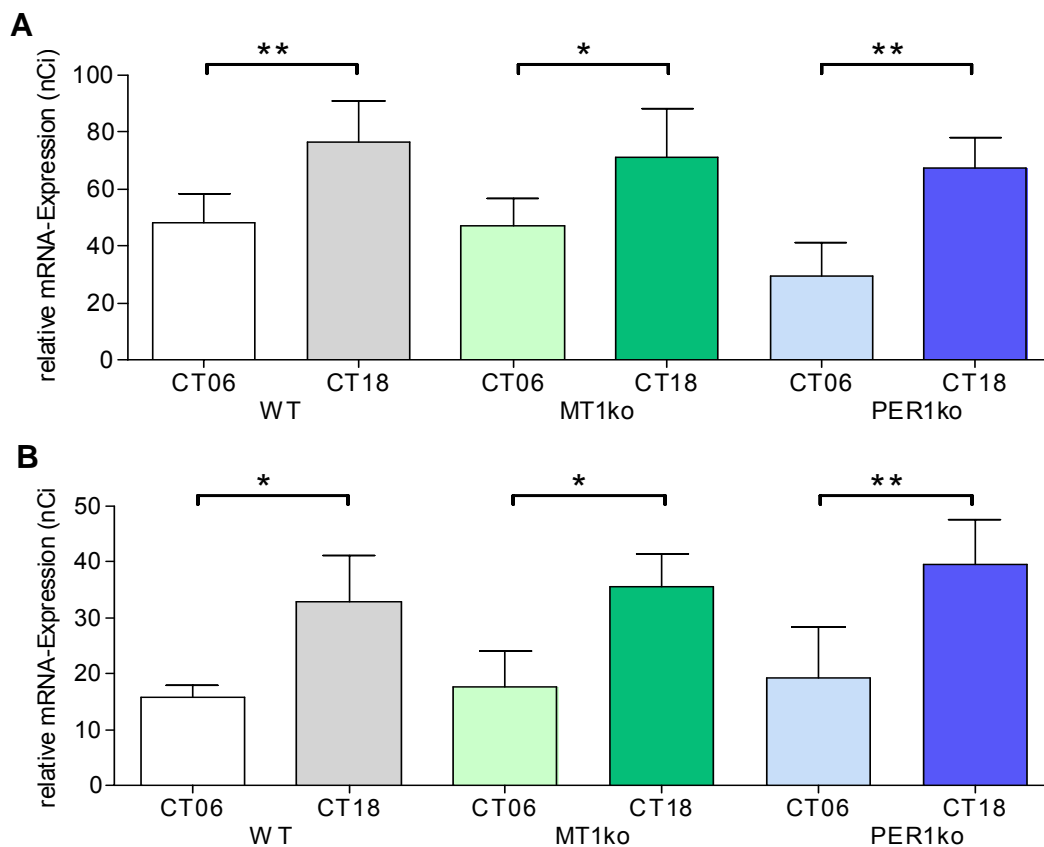


Abb. 19: Expression der *Dbp*-mRNA in der hippocampalen CA1- und CA3-Region von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

Profil der *Dbp*-Expression (A) in der CA1-Region und (B) in der CA3-Region. Bei allen Genotypen wird die *Dbp*-mRNA deutlich stärker in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) im Vergleich zum subjektiven Tag (CT06) exprimiert. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; *p < 0,05, **p < 0,01).

3.2.1.4 Steuerung der *Npas4*-Genexpression

Obwohl die Funktion von NPAS4 (*neuronal PAS domain protein4*) noch nicht bekannt ist, kann aufgrund seiner Struktur davon ausgegangen werden, dass es sich um einen transkriptionellen Regulator handelt (Shamloo et al., 2006). Daher wird seine Steuerung in diesem Kapitel behandelt.

Die *in situ*-Hybridisierung bestätigte das Ergebnis der Mikroarray-Analyse (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2.1, Tab. 7), dass *Npas4* ein ähnliches Expressionsmuster in der PT der Maus wie *Cry1* (zum Vergleich siehe Kapitel 3.2.1.1, Abb.8) in der PT der Maus aufweist. *Npas4* zeigte beim WT und bei der PER1ko-Maus eine signifikant höhere mRNA-Expression in der subjektiven Nacht (CT18) als am subjektiven Tag (CT06). Bei den MT1ko-Mäusen war nur ein geringer Gehalt an *Npas4*-Transkripten nachweisbar, die Transkripte wiesen keinen Tag/Nacht Unterschied auf. Jedoch war die Intensität des *Npas4-in situ*-Hybridisierungssignals bei den PER1ko-Mäusen im Vergleich zum WT deutlich erniedrigt (Abb. 20C). Dies deutet darauf hin, dass neben Melatonin möglicherweise auch das molekulare Uhrwerk einen Einfluss auf die *Npas4*-Expression in der PT besitzen könnte.

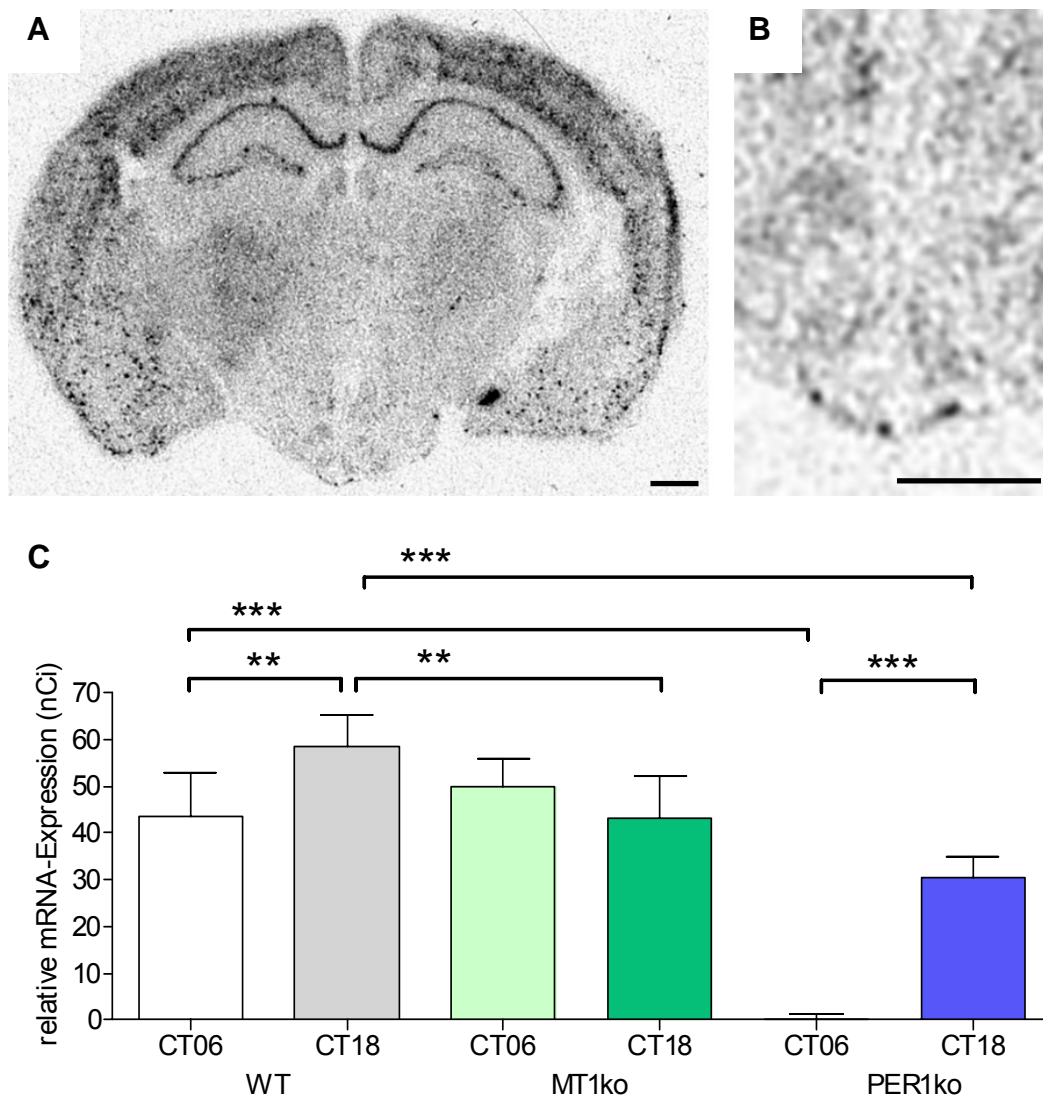


Abb. 20: Expression der *Npas4*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Npas4*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m.

C) Profil der *Npas4*-Expression in der PT. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Npas4*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als am subjektiven Tag (CT06). Ferner war die *Npas4*-Expression bei den PER1ko-Mäusen im Gegensatz zum WT und den MT1ko-Mäusen zu beiden Zeitpunkten deutlich erniedrigt. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Obwohl diese Ergebnisse auf eine Aktivierung der *Npas4*-Expression in der PT durch Melatonin hindeuten, führte eine Behandlung mit exogenem Melatonin weder nach zwei noch nach vier Stunden zu einer Zunahme an *Npas4*-Transkripten in der PT der Maus. Auch eine serielle Melatoninapplikation für die Dauer von drei Tagen hatte keinen Effekt auf die *Npas4*-Expression (Daten nicht gezeigt).

Ein starkes Hybridisierungssignal für *Npas4* zeigte sich nicht nur in der PT, sondern auch in verschiedenen anderen Hirnregionen, wie im Hippocampus und in den *Nuclei habenulares* (NH). Interessanterweise war ein Tag/Nacht Unterschied nur in der *Cornu ammonis1*- (CA) Region und im *Gyrus dentatus* (GD), nicht aber in der CA3-Region des Hippocampus festzustellen. Auch die NH wiesen keinen Tag/Nacht Unterschied auf (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 21A zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm der *Npas4*-Expression im koronalen Gewebeschnitt der WT-Maus zu den Zeitpunkten CT06 und CT18. In der CA1-Region (Abb. 21B) und im GD (Abb. 22) wurde *Npas4* deutlich stärker am Tag (CT06) als in der Nacht (CT18) exprimiert, und zwar sowohl beim WT- als auch bei den PER1ko-Mäusen (Abb. 21C). Dagegen war die *Npas4*-Expression in den MT1ko-Mäusen in diesen hippocampalen Arealen am Tag und in der Nacht annähernd gleich stark.

Diese Befunde könnten eine hemmende Wirkung von Melatonin auf die *Npas4*-Expression im GD und in der CA1-Region des Hippocampus andeuten. Jedoch konnte dies durch eine Behandlung mit exogenem Melatonin nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), da weder eine akute noch eine serielle Melatoninapplikation zu einer Zunahme an *Npas4*-Transkripten in der GD und der CA1-Region des Hippocampus der Maus führte.

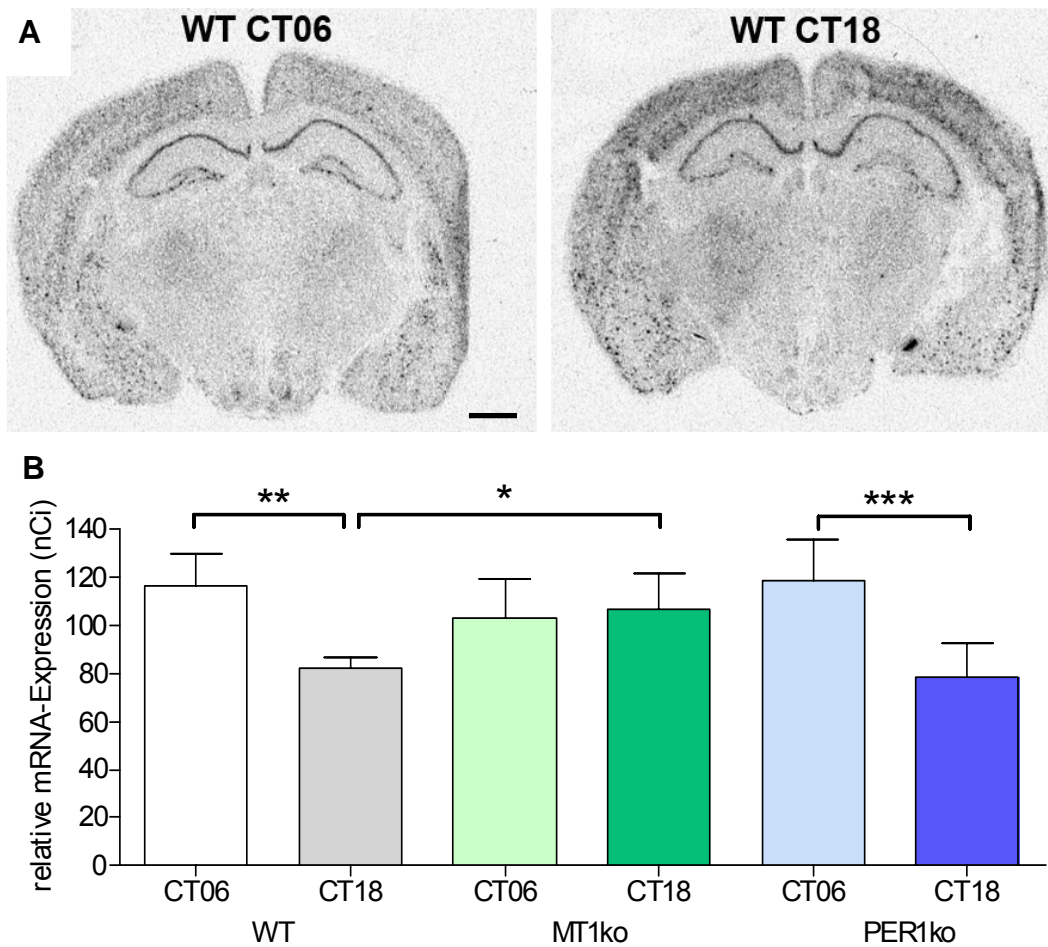


Abb. 21: Expression der *Npas4*-mRNA in der CA1-Region von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarische Autoradiogramme der *Npas4*-Expression zum Zeitpunkt CT06 und CT18. Koronale Gehirnschnitte der WT-Maus. Maßstab 500 μ m.

B) Profil der *Npas4*-Expression in der CA1-Region. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Npas4*-Expression beim WT und der PER1ko-Maus in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) deutlich niedriger als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

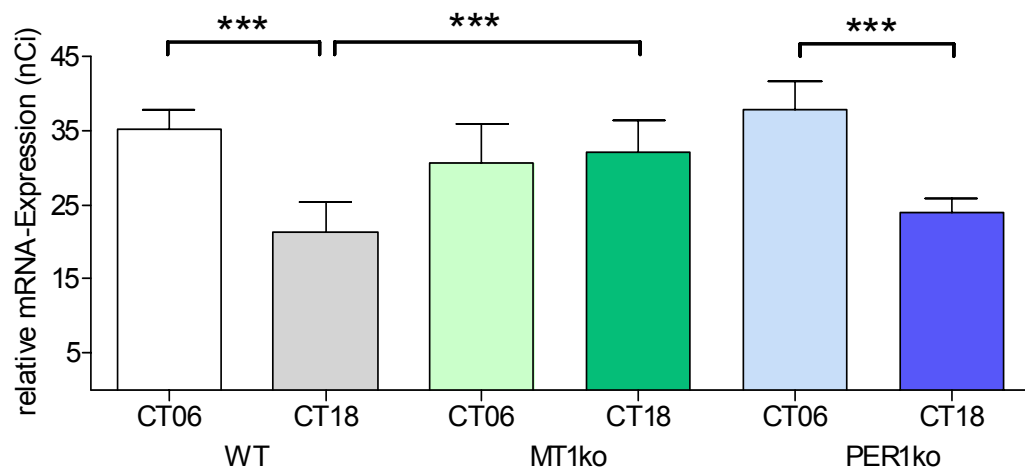


Abb. 22: Expression der *Npas4*-mRNA im GD von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen. Profil der *Npas4*-Expression im GD. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Npas4*-Expression beim WT und der PER1ko-Maus in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) deutlich niedriger als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Im SCN konnte zu den Zeitpunkten CT06 und CT18 und bei allen untersuchten Genotypen keine *Npas4*-Expression nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.2.1.5 Steuerung der *Neurod1*-Genexpression

Die *in situ*-Hybridisierung bestätigte das Ergebnis der Mikroarray-Analyse (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2.1, Tab. 6), dass *Neurod1* ein ähnliches Expressionsmuster wie *Cry1* (zum Vergleich siehe Kapitel 3.2.1.1, Abb. 8) aufwies. *Neurod1* zeigte im WT und in der PER1ko-Maus eine signifikant stärkere mRNA-Expression in der subjektiven Nacht (CT18) als am subjektiven Tag (CT06). Dagegen war bei den MT1ko-Mäusen sowohl am subjektiven Tag als auch in der subjektiven Nacht nur ein geringer Gehalt an *Neurod1*-Transkripten festzustellen (Abb. 23C).

Obwohl diese Ergebnisse eine Aktivierung der *Neurod1*-Expression in der PT durch Melatonin andeuten könnten, führte eine Behandlung mit exogenem Melatonin weder nach zwei noch nach vier Stunden zu einer Zunahme an *Neurod1*-Transkripten. Auch eine serielle Melatonin-Applikation für die Dauer von drei Tagen hatte keinen Effekt auf die *Neurod1*-Expression (Daten nicht gezeigt).

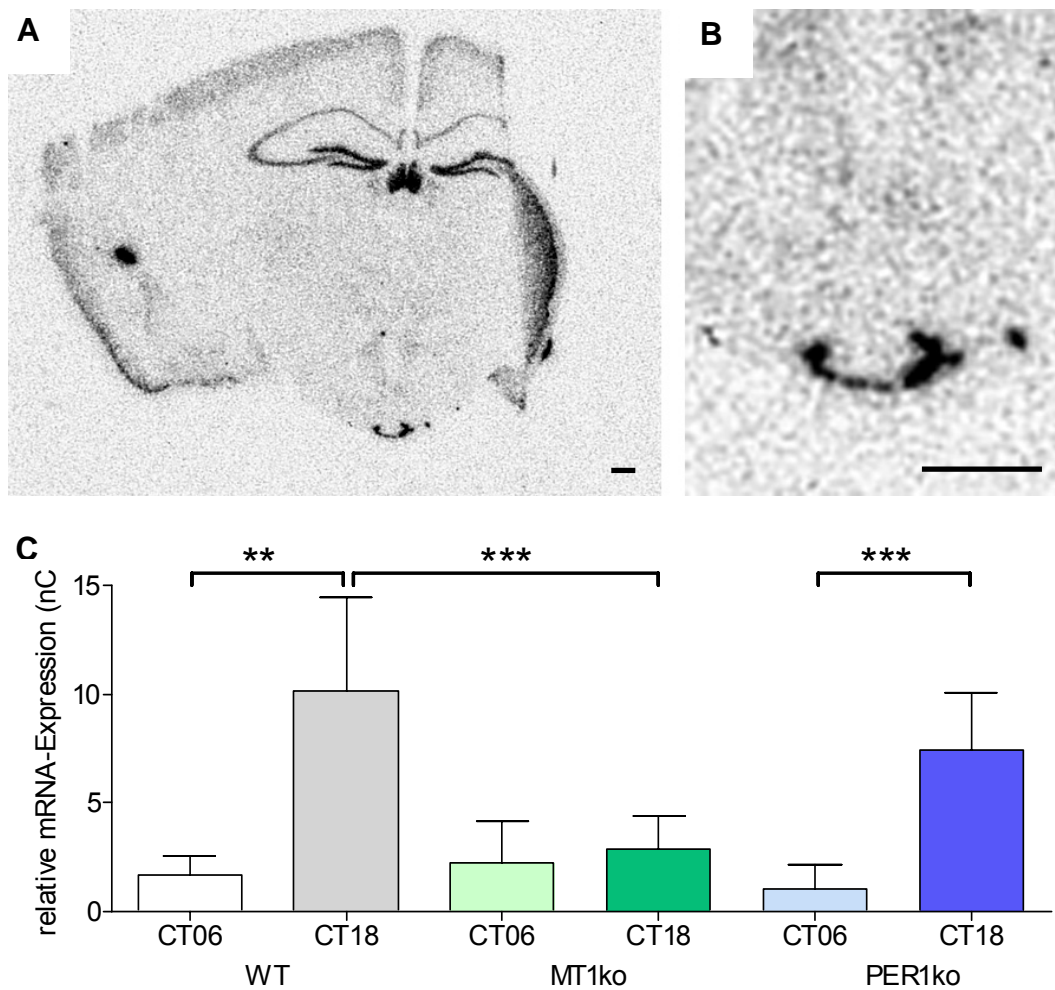


Abb. 23: Expression der *Neurod1*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der maximalen *Neurod1*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m.

C) Quantifizierung der *Neurod1*-Expression in der PT. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Neurod1*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als am subjektiven Tag (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2.2 Steuerung von Genen, die an endokrinen Prozessen beteiligt sind

3.2.2.1 Steuerung der *Pomc1*-Genexpression

Die Analyse der Proopiomelanocortin1- (*Pomc1*) Autoradiogramme zeigte kein spezifisches *in situ*-Hybridisierungssignal in der PT, jedoch im *Nucleus arcuatus* (NA). In Abbildung 24A ist ein repräsentatives Autoradiogramm mit maximaler *Pomc1*-Expression in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) im NA einer WT-Maus dargestellt.

Die *Pomc1*-Expression im NA war bei der WT- und der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) im Vergleich zur Mitte des subjektiven Tages (CT06) signifikant erhöht (Abb. 24C). Dieser Tag/Nacht Unterschied war bei den MT1ko-Mäusen aufgehoben, und die Expression zum Zeitpunkt CT18 war bei der MT1ko-Maus deutlich geringer als bei der WT-Maus. Dies könnte auf eine aktivierende Wirkung des Melatonins auf die *Pomc1*-Expression im NA der Maus hindeuten.

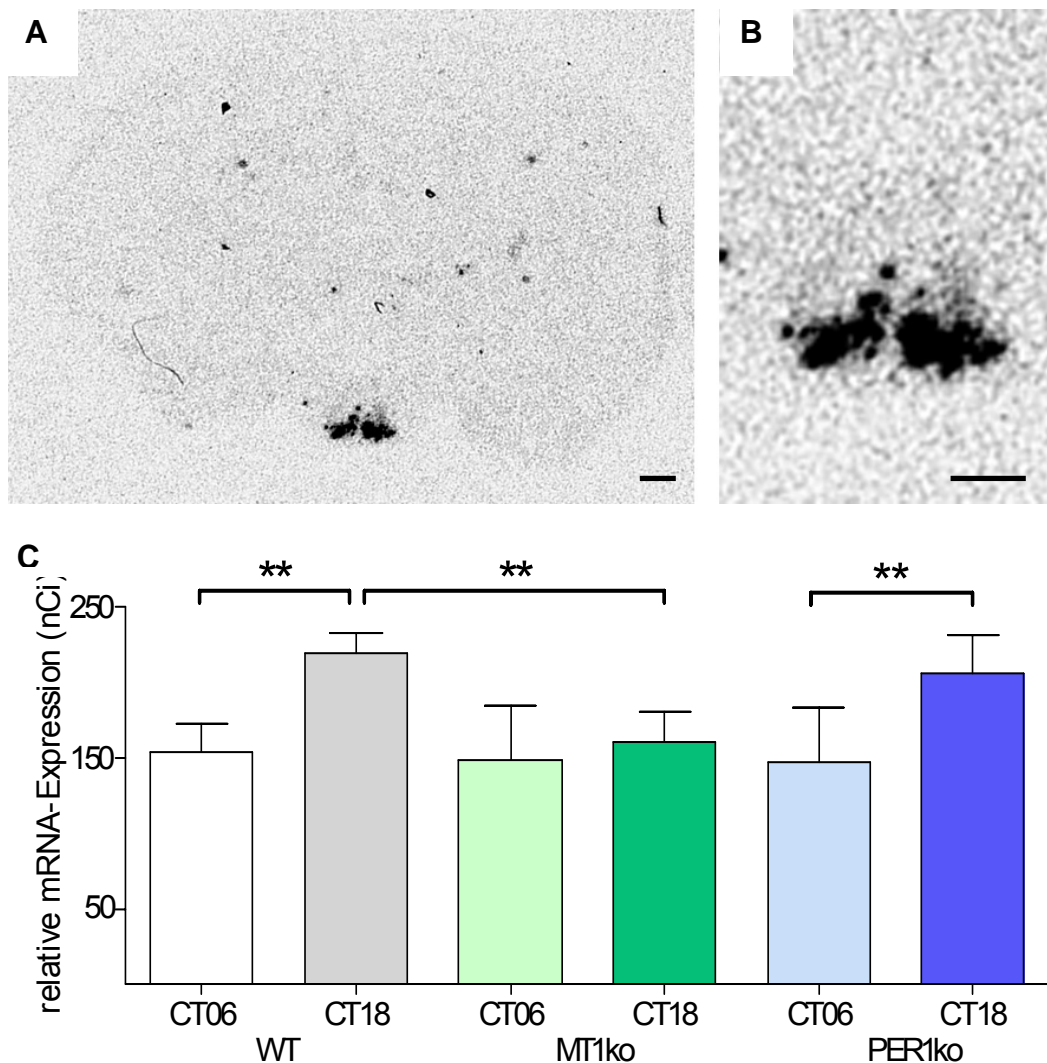


Abb. 24: Expression der *Pomc1*-mRNA im NA von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.
A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Pomc1*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 450 μ m.
B) Vergrößerung der NA-Region. Maßstab 450 μ m.
C) Profil der *Pomc1*-Expression im NA. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Pomc1*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als am subjektiven Tag (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; **p < 0,01).

Nachfolgend wurde überprüft, ob die *Pomc1*-Genexpression im NA durch exogenes Melatonin am Tage induziert wird. Dabei zeigte sich, dass es zwei bzw. vier Stunden nach Melatonin-Applikation zu einer deutlichen Steigerung der mRNA-Expression (* $p > 0,05$) des *Pomc1*-Gens kam. Eine serielle Behandlung mit exogenem Melatonin verstärkte diesen Effekt nur geringfügig (** $p > 0,01$; Abb. 25).

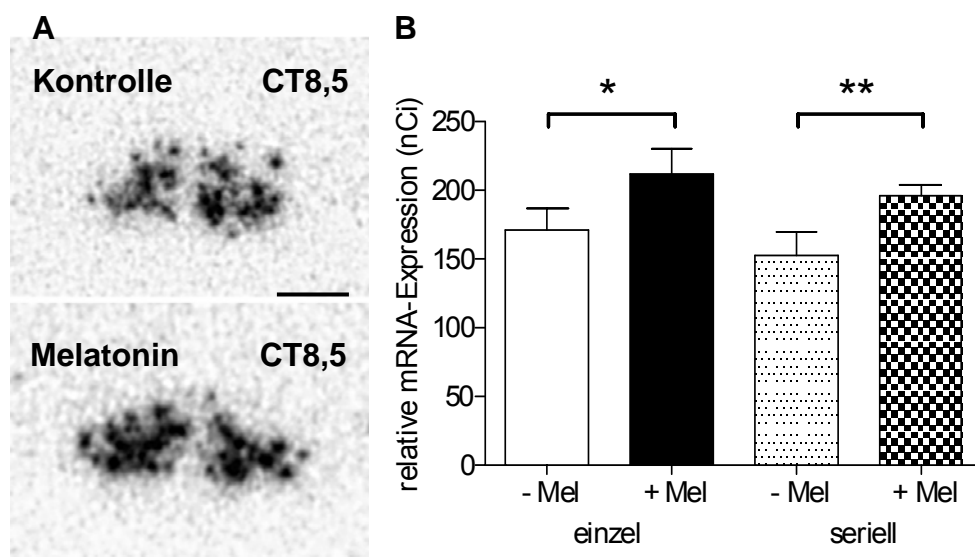


Abb. 25: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Pomc1*-Expression bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Pomc1*-Expression im NA. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 μm .

B) Eine Einzelinjektion des Melatonins induzierte die *Pomc1*-Expression nach zwei Stunden im NA. Dieser Effekt wurde durch eine serielle Melatonin-Applikation nur geringfügig verstärkt (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$).

3.2.2.2 Steuerung der *Esr1*-Genexpression

Auch der Östrogenrezeptor1 (*Esr1*) war nicht - wie aufgrund der Mikroarray-Analyse erwartet - in der PT, sondern im NA exprimiert. Abbildung 26A zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm mit maximaler mRNA-Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) im NA einer MT1ko-Maus.

Die Expression des *Esr1*-Gens war in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) bei der MT1ko-Maus deutlich stärker als bei der WT-Maus (Abb. 26C). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Expression von *Esr1* im NA indirekt über Melatonin gesteuert wird. Darüberhinaus war die *Esr1*-Expression in der MT1ko-Maus am Tag stärker als bei Nacht.

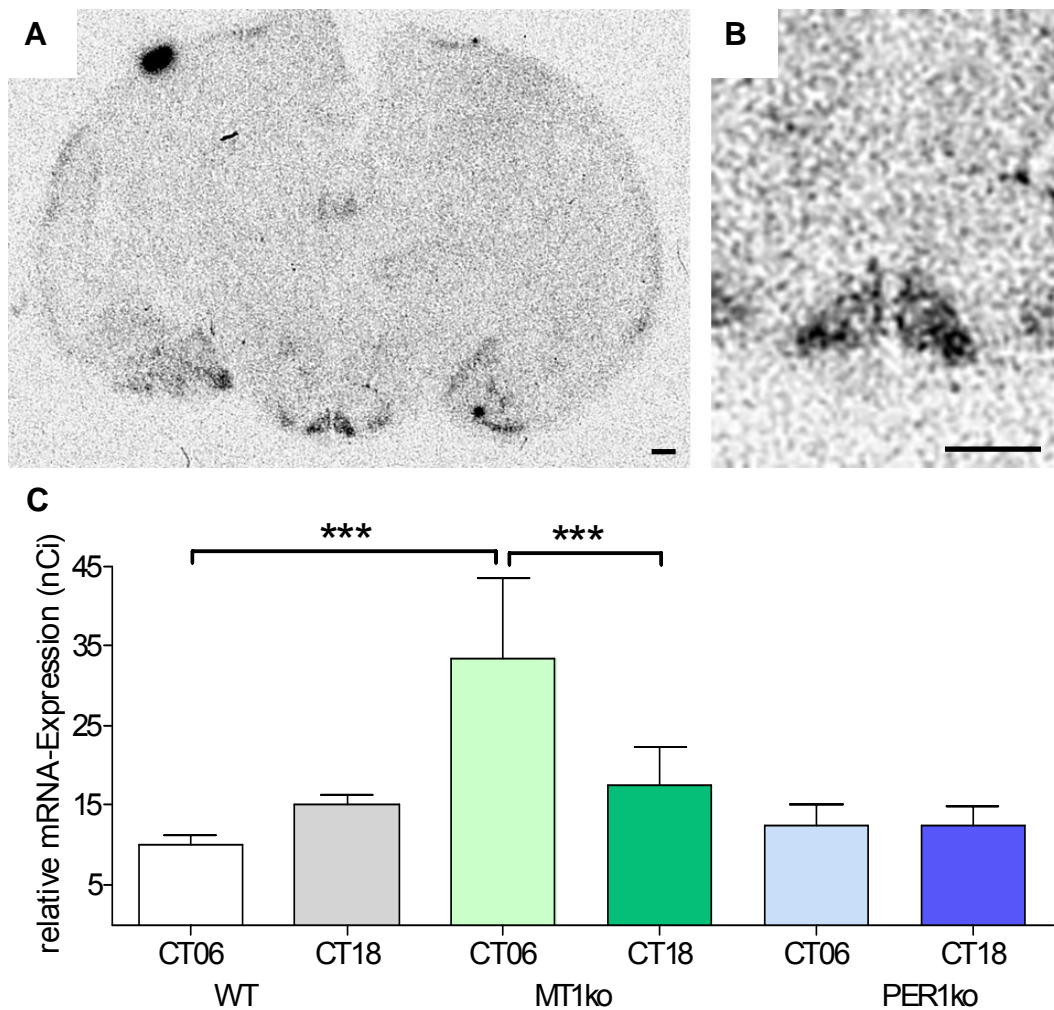


Abb. 26: Expression der *Esr1*-mRNA im NA von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Esr1*-Expression zum Zeitpunkt CT06. Koronaler Gehirnschnitt der MT1ko-Maus. Maßstab 500 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 500 μ m.

C) Profil der *Esr1*-Expression im NA. Bei CT06 war die *Esr1*-Expression der MT1ko-Maus im Vergleich zum WT signifikant herauf reguliert. Bei den MT1ko-Mäusen war die Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) signifikant höher als zur Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; $***p < 0,001$).

3.2.2.3 Steuerung der *Tafa3*-Genexpression

Die genaue Funktion von Tafa3 ist noch nicht geklärt, vermutlich handelt es sich um ein kleines sezerniertes Peptid (Tang et al., 2004). Daher wird die Regulation der *Tafa3*-Genexpression in diesem Kapitel behandelt.

Überraschenderweise war das *Tafa3*-mRNA Signal in der *in situ*-Hybridisierung (Abb. 27) anders als in der Mikroarray-Analyse. Laut Mikroarray-Analyse könnte davon ausgegangen werden, dass Melatonin die *Tafa3*-Expression in der PT hemmt (siehe Kapitel 3.1.2.1, Tab. 7). In der *in situ*-Hybridisierung zeigte *Tafa3* jedoch ein ähnliches Expressionsmuster (Abb. 27C) wie *Npas4* (zum Vergleich siehe 3.2.1.4, Abb. 21C): beim WT und bei der PER1ko-Maus war die *Tafa3*-Expression in der subjektiven Nacht (CT18) signifikant höhere als zur Mitte des subjektiven Tages (CT06). Bei den MT1ko-Mäusen war nur ein geringer Gehalt an *Tafa3*-Transkripten nachweisbar, der keinen Tag/Nacht Unterschied zeigte. In den PER1ko-Mäusen war die Intensität der *Tafa3*-Hybridisierungssignale sowohl am Tag als auch bei Nacht im Vergleich zum WT deutlich erniedrigt. Dies deutet darauf hin, dass neben der aktivierenden Wirkung des Melatonins möglicherweise auch das molekulare Uhrwerk einen Einfluss auf die *Tafa3*-Expression in der PT haben könnte.

Obwohl dieses Ergebnis eine Aktivierung der *Tafa3*-Expression in der PT durch Melatonin nahelegen könnten, führte die Gabe von exogenem Melatonin weder nach zwei noch nach vier Stunden zu einer Zunahme des Gehalts an *Tafa3*-Transkripten. Auch eine serielle

Melatoninapplikation für die Dauer von drei Tagen hatte keinen Effekt auf die *Tafa3*-Expression (Daten nicht gezeigt).

Im SCN war zu den untersuchten Zeitpunkten bei allen Genotypen keine *Tafa3*-Expression nachweisbar (nicht gezeigt).

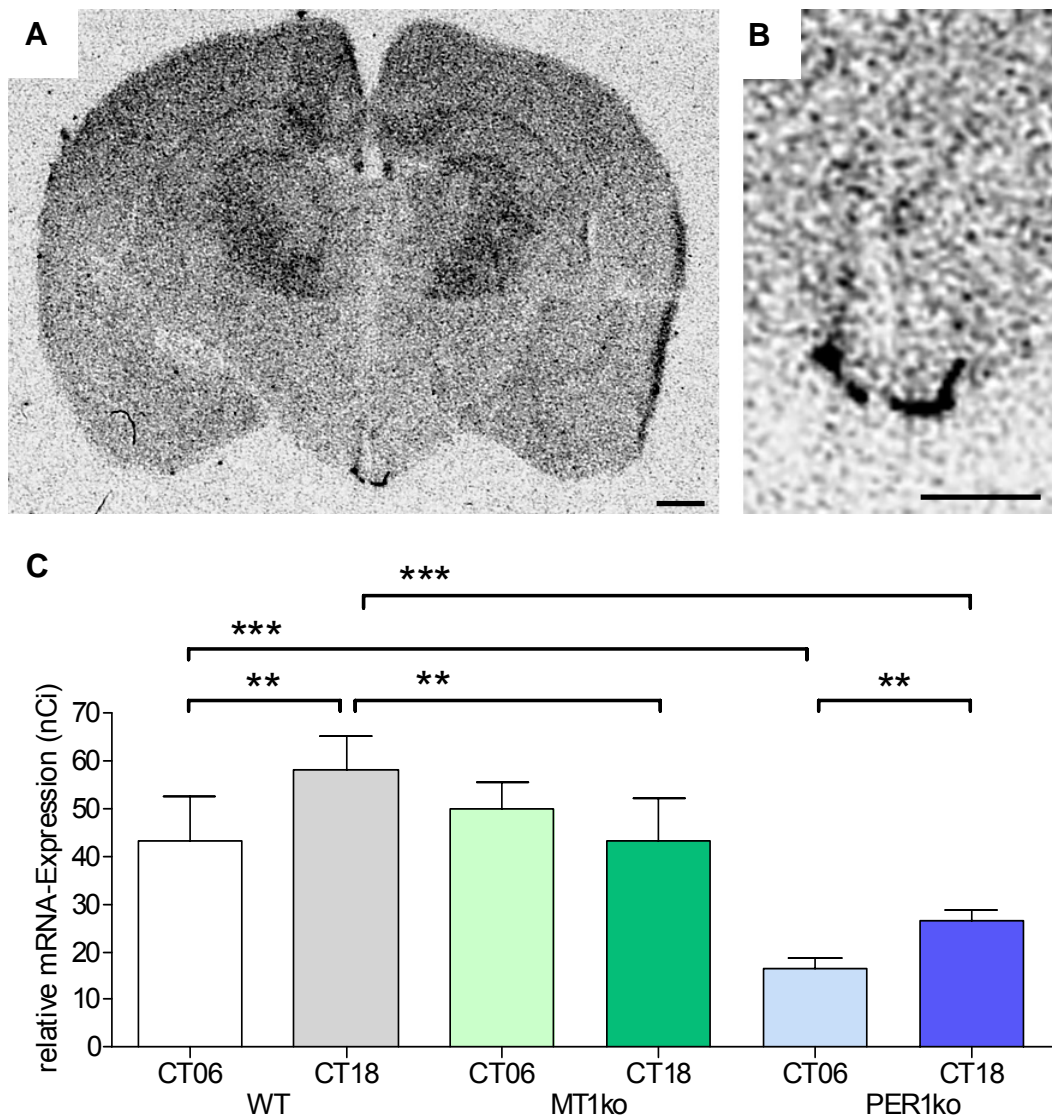


Abb. 27: Expression der *Tafa3*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen. A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Tafa3*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m. B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m. C) Profil der *Tafa3*-Expression in der PT. Im Vergleich zur MT1ko-Maus war die *Tafa3*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als am subjektiven Tag (CT06). Bei den PER1ko-Mäusen war die *Tafa3*-Expression im Gegensatz zum WT und den MT1ko-Mäusen zu beiden Zeitpunkten deutlich erniedrigt. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; **p < 0,01; ***p < 0,001).

3.2.2.4 Steuerung der *Lhb*-Genexpression

Wie aufgrund der Mikroarray-Analyse erwartet (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2.2, Tab. 9), zeigte die Analyse der *in situ*-Autoradiogramme beim WT eine deutlich stärkere mRNA-Expression für die beta-Untereinheit des luteinisierenden Hormons (*Lhb*) in der subjektiven Nacht (CT18) als am subjektiven Tag (CT06; Abb. 28C). Dies könnte bereits auf eine Hemmung der *Lhb*-Expression durch den am Tag vorhandenen NRC hindeuten. Bei den MT1ko-Mäusen war der Gehalt an *Lhb*-Transkripten am Tag und in der Nacht annähernd gleich hoch. Dies könnte durch das Fehlen des NRC bei MT1ko-Mäusen erklärt werden. Bei den PER1ko-Mäusen war die *Lhb*-Expression am Tag erhöht, wie das Fehlen des NRC erwarten lässt. Jedoch war die *Lhb*-Expression in den PER1ko-Mäusen in der Nacht erniedrigt, was auf eine zusätzliche leichte hemmende Wirkung durch Melatonin hindeuten könnte.

Um die hemmende Wirkung des Melatonins auf die *Lhb*-Expression zu überprüfen, wurde auch hier eine Behandlung mit exogenem Melatonin vorgenommen. Tatsächlich führte die Applikation von exogenem Melatonin zu einem deutlich erniedrigten Gehalt an *Lhb*-Trankripten in der PT der Maus (Abb. 29).

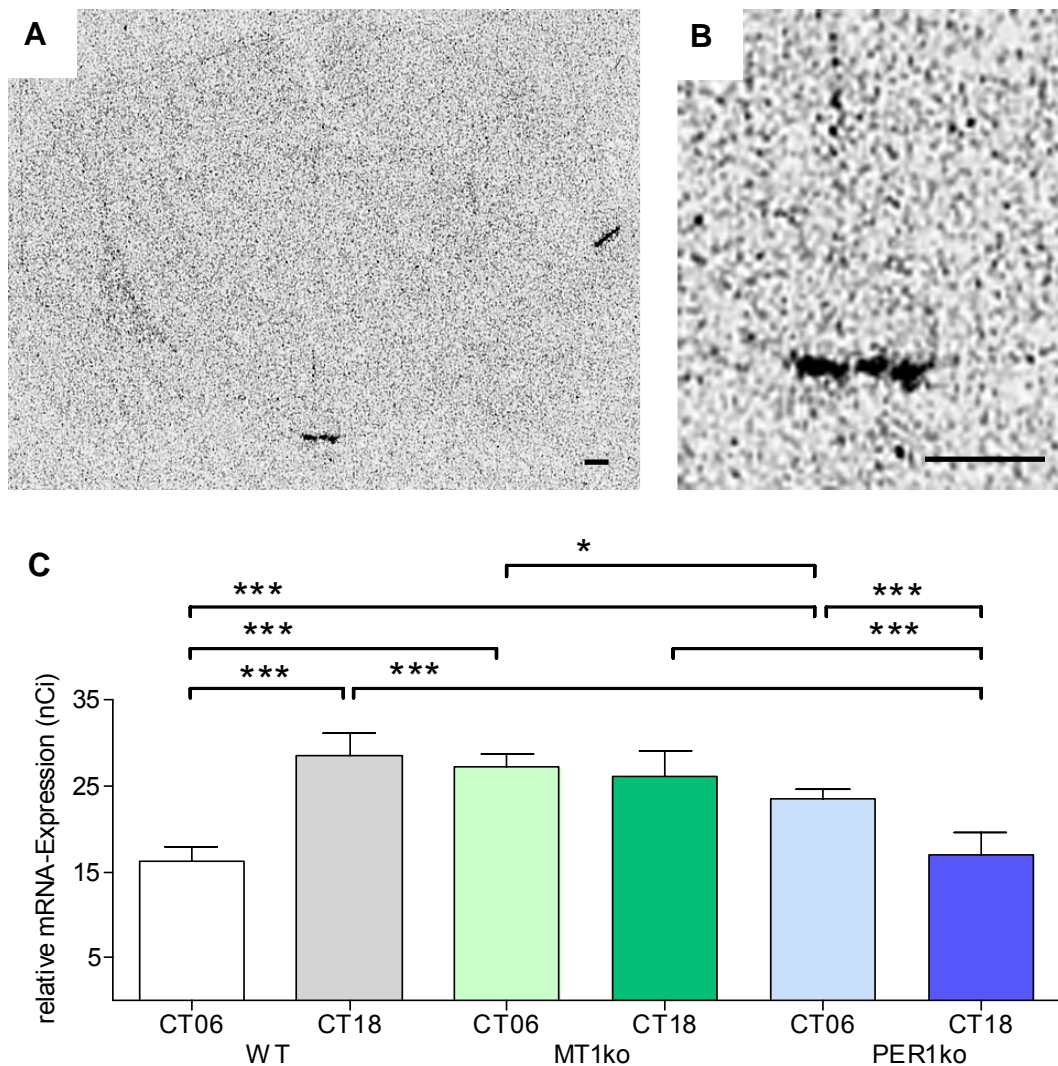


Abb. 28: Expression der *Lhb*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Lhb*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 350 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 350 μ m.

C) Profil der *Lhb*-Expression in der PT. Im WT war die *Lhb*-Expression bei CT18 im Vergleich zu CT06 signifikant höher. In den MT1ko- und PER1ko-Mäusen war die *Lhb*-Expression bei CT06 höher als im WT. Bei der PER1ko-Maus war die mRNA-Expression höher bei CT06 als bei CT18. Im Vergleich zu den MT1ko-Mäusen zeigten die PER1ko-Mäuse eine signifikant herab regulierte *Lhb*-Expression. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

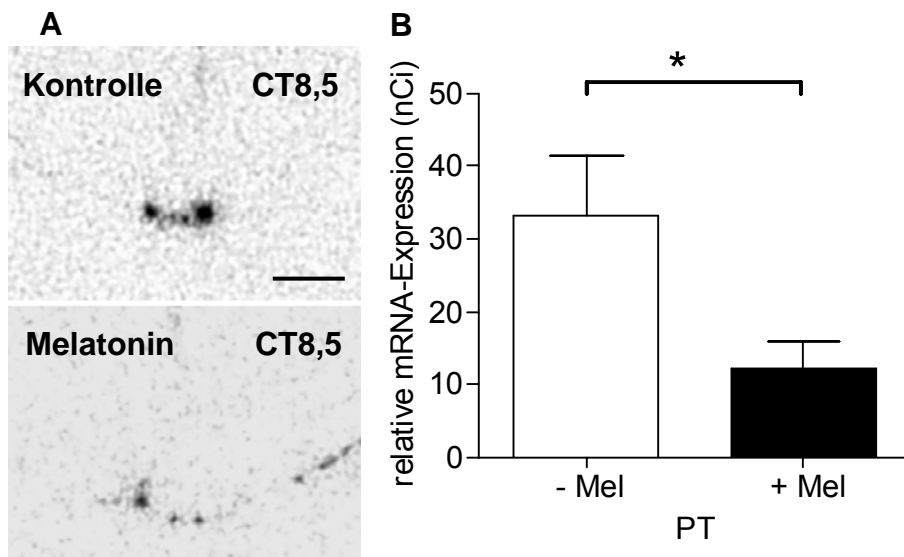


Abb. 29: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Lhb*-Expression im WT bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Lhb*-Expression in der PT. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 µm.

B) Melatonin hemmt die *Lhb*-Expression in der PT der Maus zwei Stunden nach Applikation (n = 4; *p > 0,05).

3.2.2.5 Steuerung der *Fshb*-Genexpression

Überraschenderweise zeigte die beta Untereinheit des follikelstimulierenden Hormons (*Fshb*) nicht das aufgrund der Mikroarray-Analyse erwartete Expressionsmuster (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2.2, Tab. 9) in der PT. Bei allen untersuchten Mäusestämmen war eine deutlich stärkere *Fshb*-Expression bei Nacht (CT18) als am Tag (CT06) zu beobachten (Abb. 30C). Dieser signifikante Tag/Nacht Unterschied deutet auf eine circadiane, aber Melatonin- und NRC-unabhängige Genregulation von *Fshb* in der PT der Maus hin.

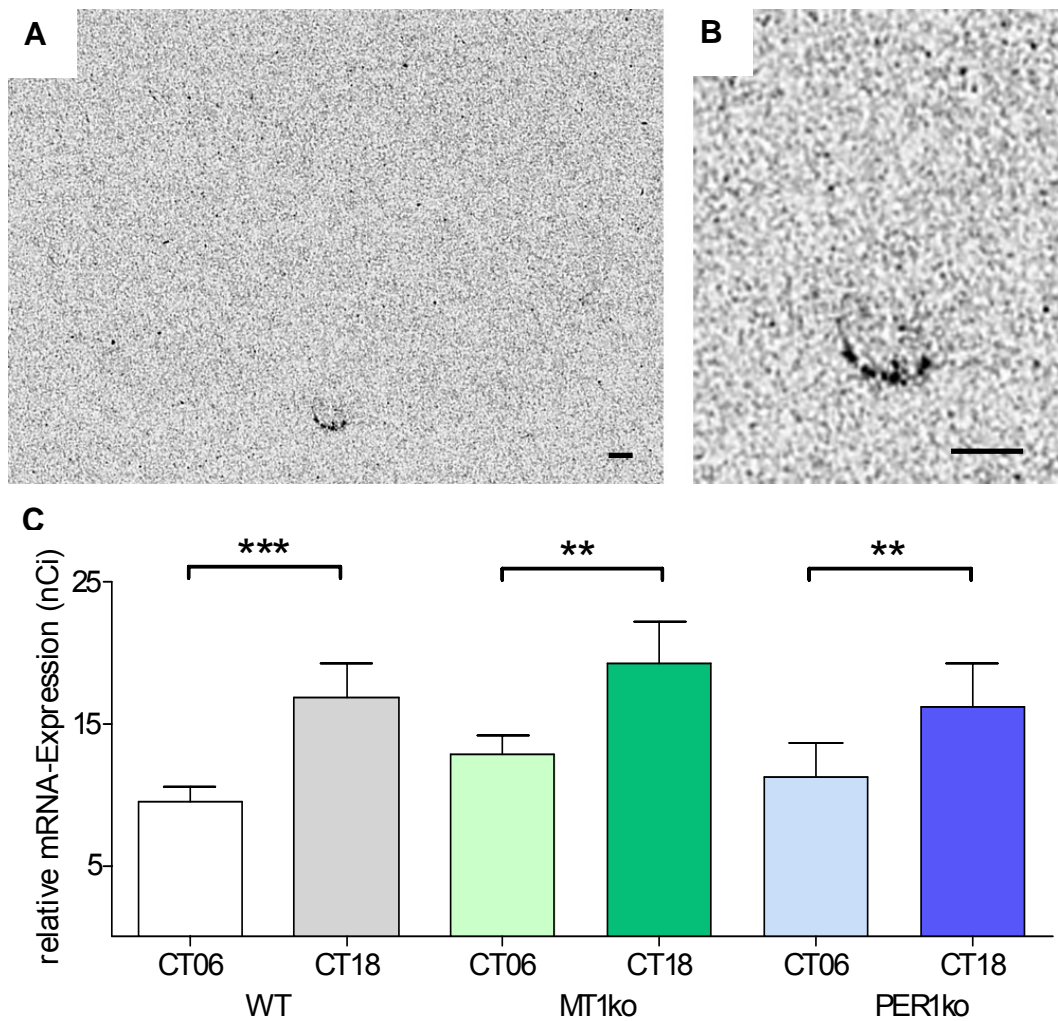


Abb. 30: Expression der *Fshb*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen. A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Fshb*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 300 μ m. B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 300 μ m. C) Profil der *Fshb*-Expression in der PT. Bei allen Genotypen war die maximale *Fshb*-Expression in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) signifikant höher als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

3.2.2.6 Steuerung der *Tshr*-Genexpression

Die *in situ*-Hybridisierung bestätigte das Ergebnis der Mikroarray-Analyse (zum Vergleich siehe Kapitel 3.1.2.1, Tab. 7), dass *Tshr* ein ähnliches Expressionsmuster wie *Cry1* aufweist (zum Vergleich siehe Kapitel 3.2.1.1, Abb. 8). Die *Tshr*-mRNA Expression war im WT und in der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) signifikant höher als am subjektiven Tag (CT06). Demgegenüber waren in den MT1ko-Mäusen sowohl bei Tag als auch bei Nacht nur geringe Mengen an *Tshr*-Transkripten in der PT nachweisbar (Abb. 31C).

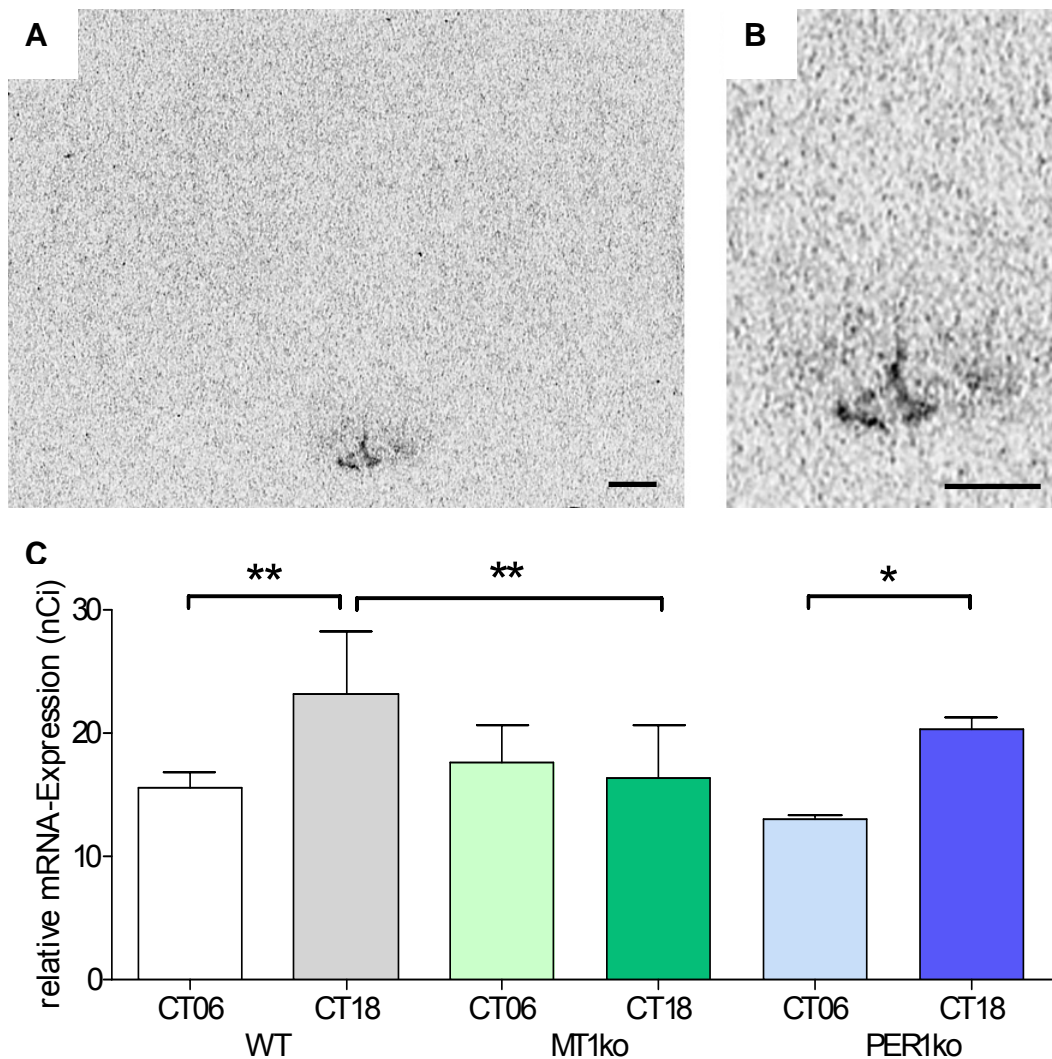


Abb. 31: Expression der *Tshr*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Tshr*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 400 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 400 μ m.

C) Profil der *Tshr*-Expression in der PT. Im Gegensatz zur MT1ko-Maus war die *Tshr*-Expression beim WT und bei der PER1ko-Maus in der subjektiven Nacht (CT18) deutlich höher als am subjektiven Tag (CT06). Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt (n = 4; *p < 0,05; **p < 0,01).

Darüber hinaus zeigte die *in situ*-Hybridisierung, dass *Tshr* nicht nur in der PT, sondern auch in der Ependymschicht des III. Ventrikels (EC) exprimiert wird.

Durch eine Behandlung mit exogenem Melatonin wurde überprüft, ob die *Tshr*-Expression in der PT der Maus durch Melatonin aktiviert wird. Tatsächlich führte exogenes Melatonin zwei Stunden nach Applikation (CT8,5) zu einer deutlichen Zunahme der *Tshr*-Expression in der PT, aber nicht in der EC der Maus (Abb. 32).

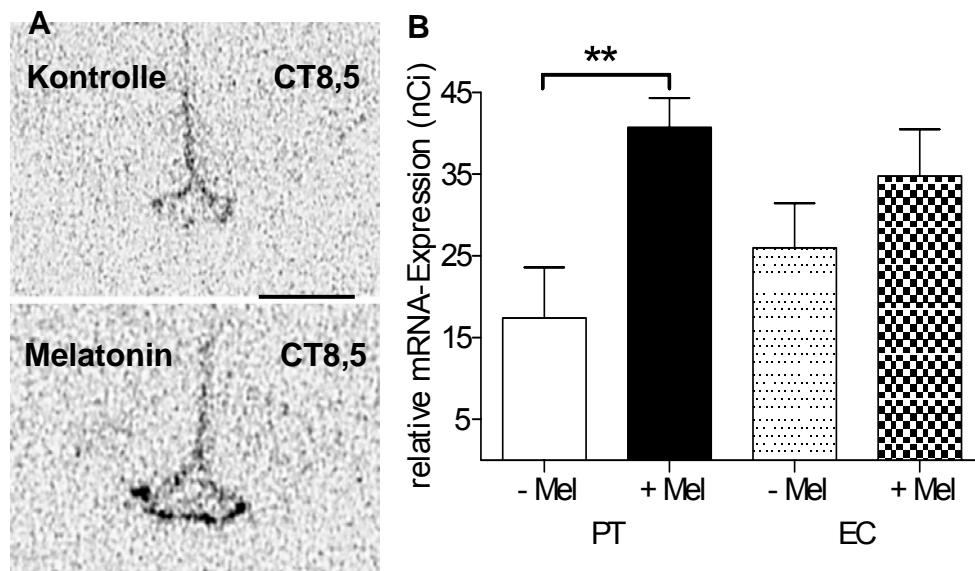


Abb. 32: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Tshr*-Expression im WT bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Tshr*-Expression in der PT. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 µm.

B) Exogenes Melatonin induziert die *Tshr*-Expression nach zwei Stunden in der PT, aber nicht in der EC der Maus (n = 4; **p > 0,01).

Die Befunde deuten darauf hin, dass die *Tshr*-Expression in der PT der Maus durch Melatonin aktiviert wird.

Im Folgenden wurde untersucht, ob auch im hypophysenvorderlappen (*Pars distalis*; PD) ein Tag/Nacht Unterschied der *Tshr*-Expression nachgewiesen werden kann. Das repräsentative Autoradiogramm der *Tshr*-mRNA in der Hypophyse (Abb. 33A) zeigte ein deutliches *in situ*-Hybridisierungssignal in der PD aber nicht in der Neurohypophyse (*Pars nervosa*; PN). Im Randbereich der PD war der Gehalt an *Tshr*-Transkripten am stärksten. Die *sense*-Kontrolle zeigte kein *Tshr*-Hybridisierungssignal in der gesamten Hypophyse (Abb. 33B). Separate Analysen vom Randbereich, von dem mittleren/helleren PD-Bereich oder von der gesamten PD zeigten keinen Tag/Nacht Unterschied der *Tshr*-Expression bei allen Genotypen. Daher ist die Steuerung der *Tshr*-Expression durch Melatonin spezifisch für die PT. Es sei an dieser Stelle daran erinnert, dass im Gegensatz zur PT in der PD adulter Nagetiere keine Melatoninrezeptoren vorkommen (Vanecek et al., 1987).

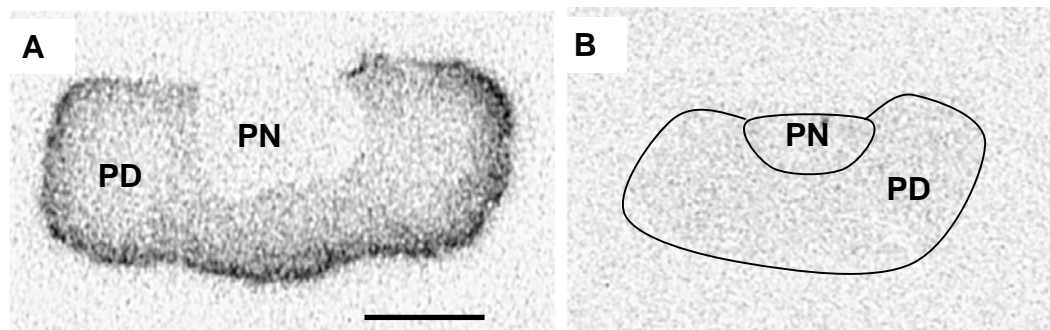


Abb. 33: Expression der *Tshr*-mRNA in der Hypophyse einer WT-Maus zum Zeitpunkt CT18.

Exemplarisches Autoradiogramm der *Tshr*-Expression mit der entsprechenden *antisense*- (A) und *sense*-Sonde (B) im koronalem Hypophysenschnitt einer WT-Maus zum Zeitpunkt CT18. Beim *sense*-Gewebeschnitt wurden die Gewebegrenzen schwarz markiert. [*Pars distalis* (PD) und *Pars nervosa* (PN)] Maßstab: 1 mm.

3.2.2.7 Steuerung der *Tshb*-Genexpression

Interessanterweise zeigte die beta-Untereinheit des Thyroidea-stimulierenden Hormons (*Tshb*) ein ähnliches Expressionsmuster (Abb. 34C) wie *Lhb* (zum Vergleich siehe 3.2.2.4, Abb. 28C): im WT war die mRNA-Expression während der subjektiven Nacht (CT18) deutlich stärker als am subjektiven Tag (CT06). Bei den MT1ko-Mäusen war der Gehalt an *Tshb*-Transkripten am Tag und in der Nacht annähernd gleich hoch. Bei den PER1ko-Mäusen war die *Tshb*-Expression am Tag erhöht und in der Nacht deutlich geringer. Dies könnte auf eine zusätzliche leichte hemmende Wirkung durch Melatonin hindeuten.

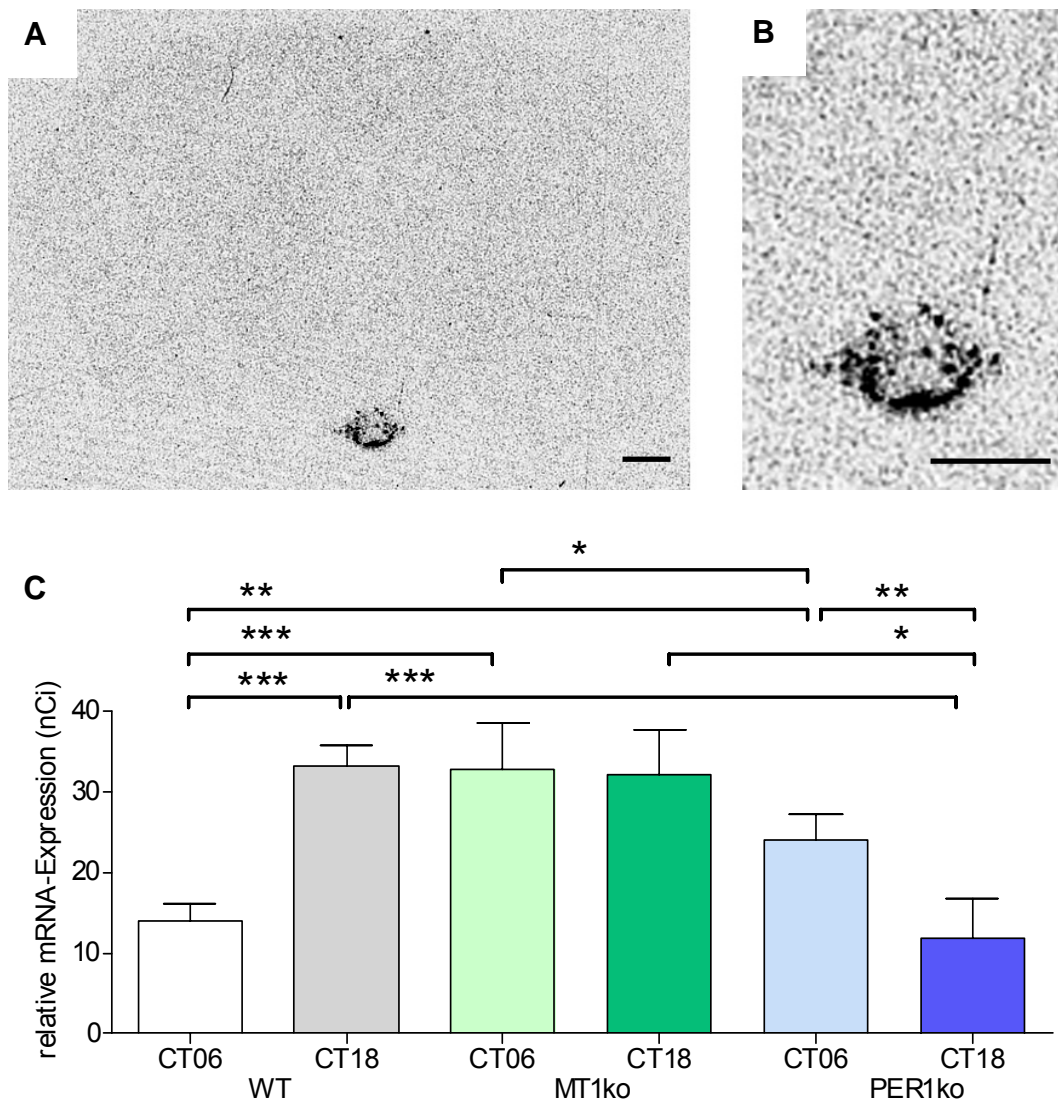


Abb. 34: Expression der *Tshb*-mRNA in der PT von WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen.

A) Exemplarisches Autoradiogramm der maximalen *Tshb*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Koronaler Gehirnschnitt der WT-Maus. Maßstab 300 μ m.

B) Vergrößerung der PT-Region. Maßstab 300 μ m.

C) Profil der *Tshb*-Expression in der PT. Im WT war die *Tshb*-Expression bei CT18 signifikant höher als bei CT06. In den MT1ko-Mäusen war die *Tshb*-Expression bei CT06 und CT18 gleich hoch. Bei der PER1ko-Maus war sie höher bei CT06 als bei CT18. Die Intensität des *in situ*-Hybridisierungssignals ist als relative mRNA-Expression in nCi dargestellt ($n = 4$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die hemmende Wirkung von Melatonin auf die *Tshb*-Expression in der PT wurde durch eine Behandlung mit exogenem Melatonin überprüft.

Exogenes Melatonin führte zu einem deutlich erniedrigten Gehalt an *Tshb*-Trankripten in der PT der Maus (Abb. 35).

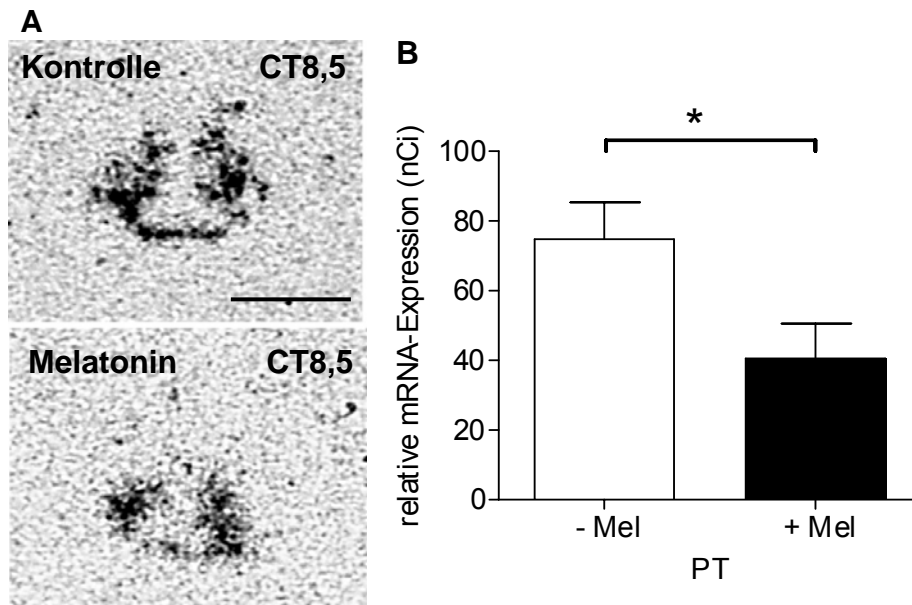


Abb. 35: Effekt der Melatonin-Applikation auf die *Tshb*-Expression im WT bei CT8,5.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Tshb*-Expression in der PT. Oben: Kontrolle. Unten: Melatonineffekt zum Zeitpunkt CT8,5. Maßstab 350 μ m.

B) Exogenes Melatonin hemmt die *Tshb*-Expression nach zwei Stunden in der PT der Maus ($n = 4$; $*p > 0,05$).

3.3 Untersuchung zur Rhythmizität von TSHb in der *Pars tuberalis*

Die Daten zur *Tshb*-Genexpression zeigen starke Unterschiede zwischen WT-, MT1ko- und PER1ko-Mäusen (zum Vergleich siehe Kapitel 3.2.2.7, Abb. 34C). Mit Hilfe der Immunzytochemie wurde untersucht, ob diese Unterschiede auch auf Proteinebene manifest werden. Um mögliche rhythmische Schwankungen von TSHb in der PT der verschiedenen Genotypen zu untersuchen, wurden die Tiere unter Dauer-Dunkel-Bedingungen (DD) gehalten und in Abständen von vier Stunden getötet.

Alle drei Genotypen zeigten zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine zytoplasmatische TSHb-Immunreaktion (TSHb-Ir) in der PT (Abb. 36, 37, 38). Das Gehirn war frei von TSHb-Ir (nicht gezeigt).

Die TSHb-Ir im WT war deutlich schwächer als bei den MT1ko-Mäusen und deutlich stärker als bei den PER1ko-Mäusen und zum Zeitpunkt CT06 signifikant geringer als zu den übrigen Zeitpunkten (Abb. 39). In der PT der MT1ko-Maus war die TSH-Ir zu allen Zeitpunkten gleichbleibend hoch. In der PT der PER1ko-Maus war die TSHb-Ir am Tag höher als in der Nacht (Abb. 39).

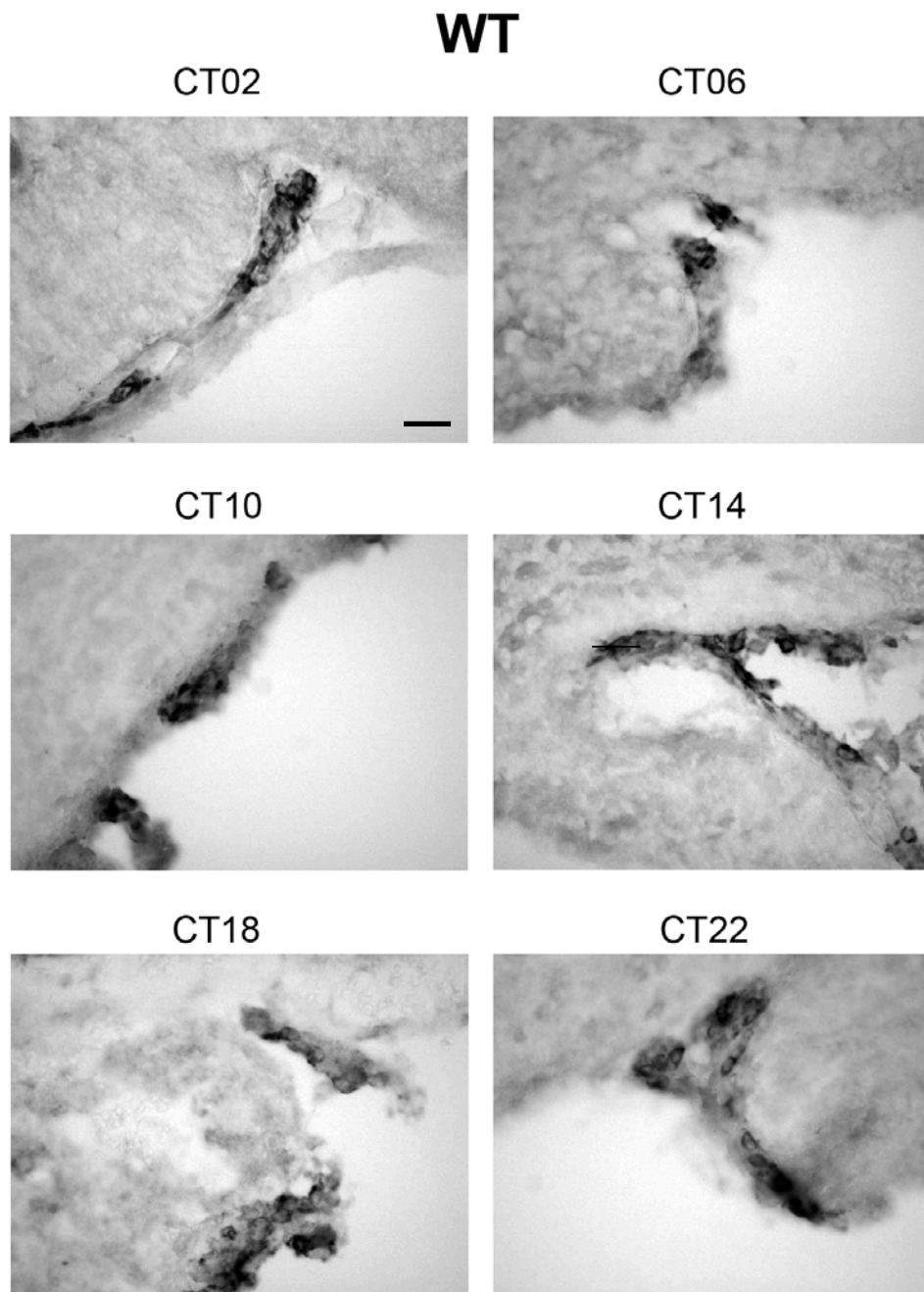


Abb. 36: TSHb-Immunreaktivität (Ir) in der PT der WT-Mäuse.

Koronale Schnitte durch die PT der Maus, die zu unterschiedlichen circadianen Zeiten (CT) getötet wurden. Maßstab: 50 μ m.

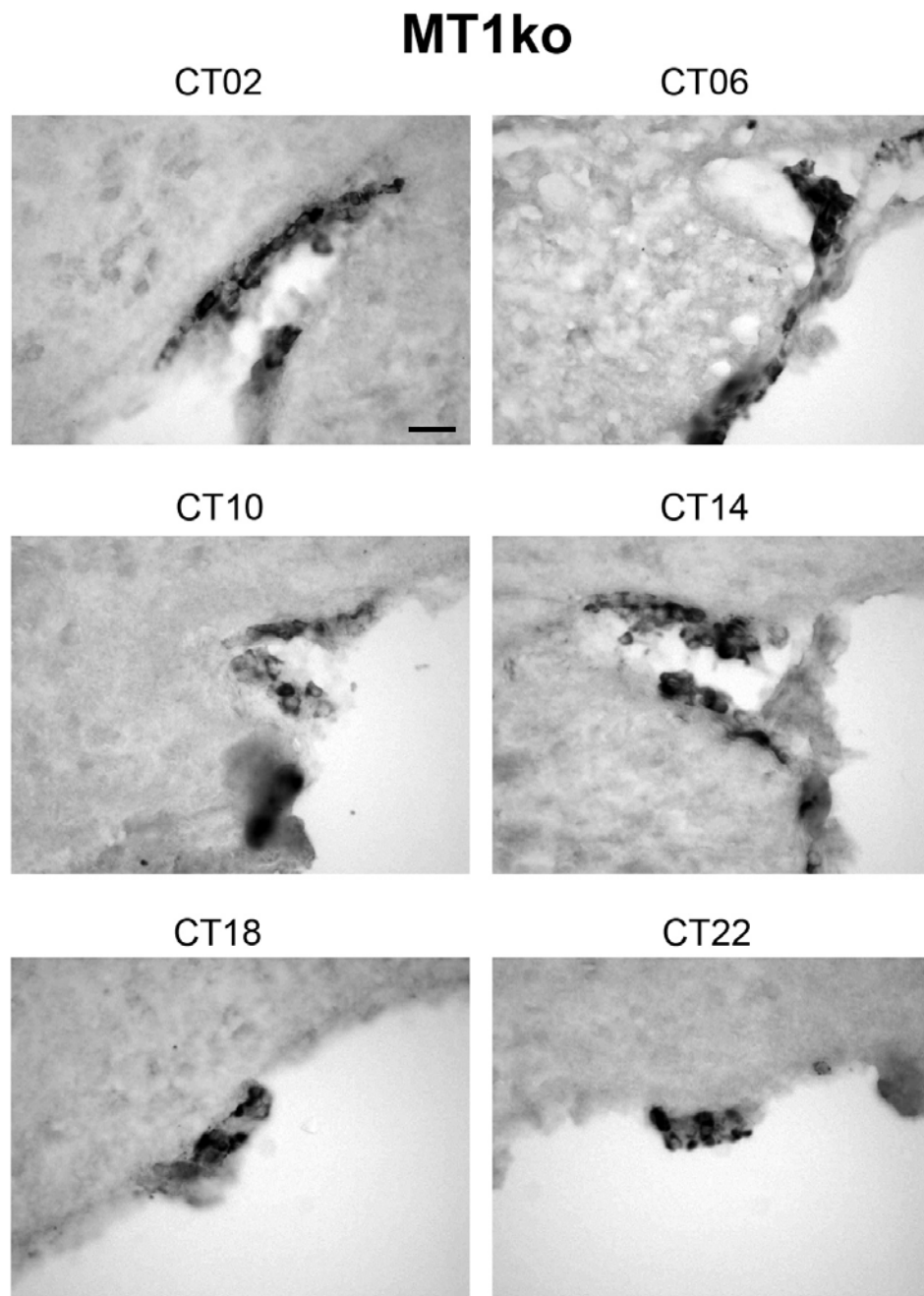


Abb. 37: TSHb-Immunreaktivität (Ir) in der PT der MT1ko-Mäuse.

Koronale Schnitte durch die PT der Maus, die zu unterschiedlichen circadianen Zeiten (CT) getötet wurden. Zu allen Zeitpunkten war eine spezifische zytoplasmatische TSHb-Ir in der PT, zu beobachten, die keine deutlichen Schwankungen aufwies. Maßstab: 50 μ m.

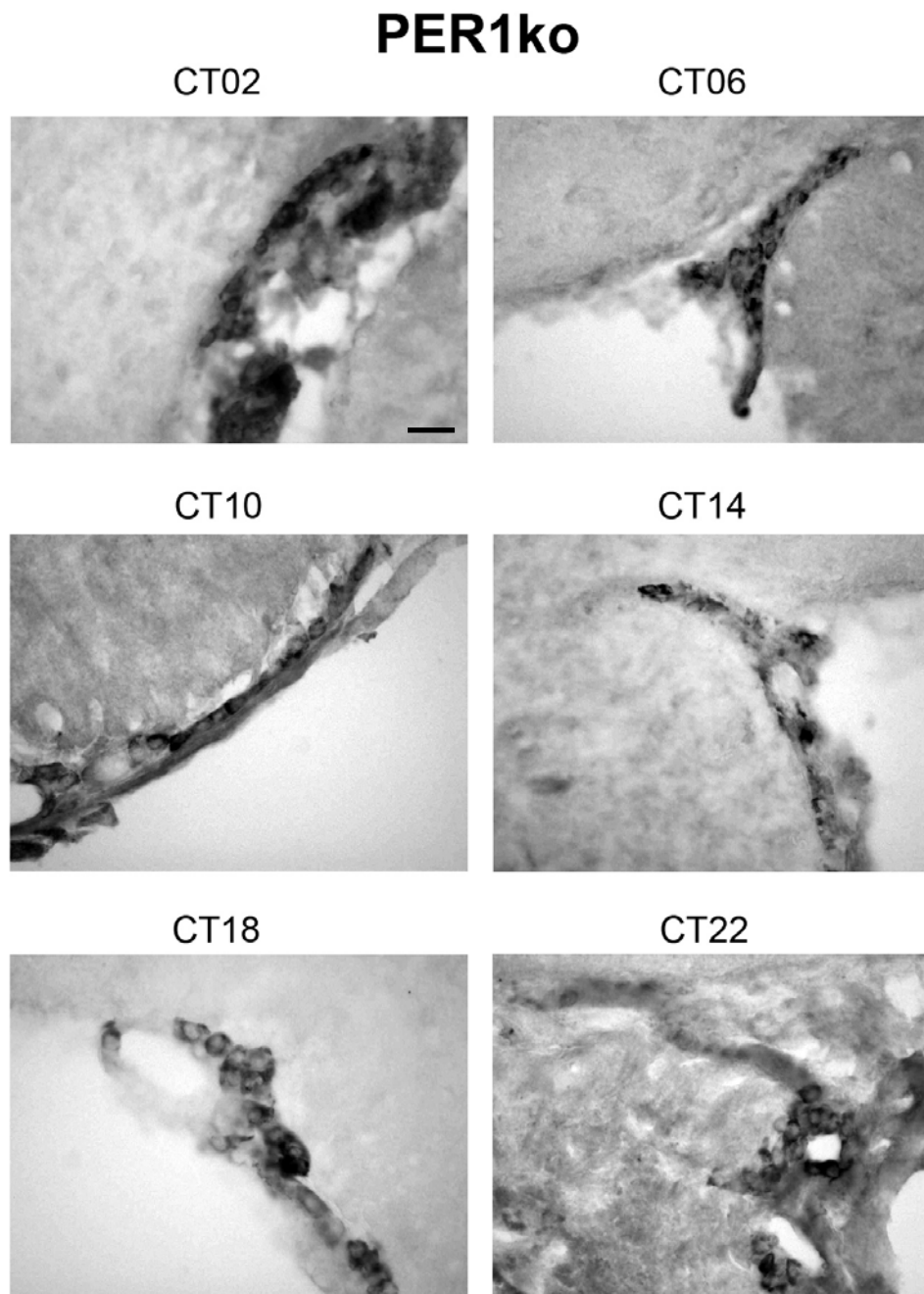


Abb. 38: TSHb-Immunreaktivität (Ir) in der PT der PER1ko-Mäuse.

Koronale Schnitte durch die PT der Maus, die zu unterschiedlichen circadianen Zeiten (CT) getötet wurden. Maßstab: 50 µm.

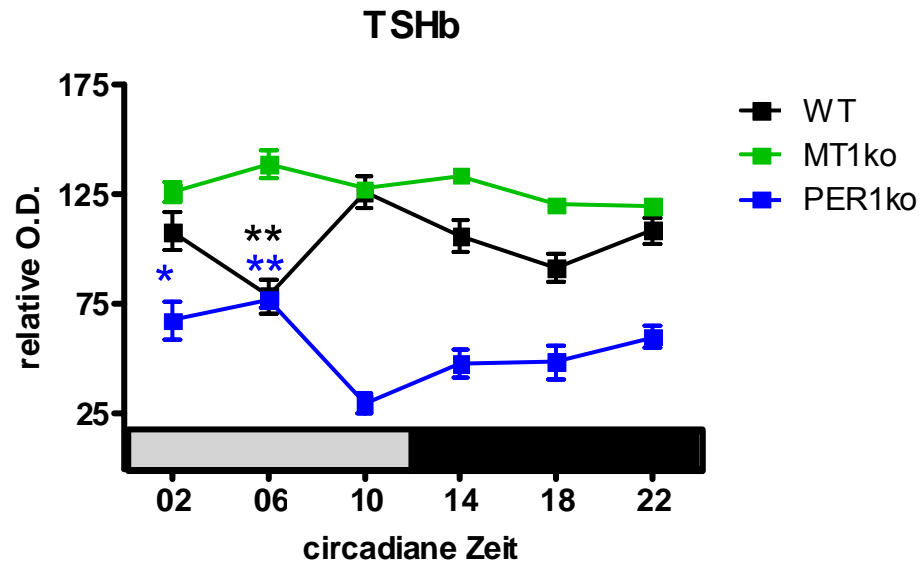


Abb. 39: Vergleich der Intensität der TSHb Immunreaktivität (TSHb-Ir) in der PT von WT- (schwarz), MT1ko- (grün) und PER1ko- (blau) Mäusen.

Die WT-Mäuse zeigten einen inversen Rhythmus zu den PER1ko-Mäusen mit einer am Tag deutlich schwächeren TSHb-Ir als bei Nacht. Demgegenüber wiesen die MT1ko-Mäuse keinen Rhythmus in der TSHb-Ir auf. Es wurden jeweils zehn immunreaktive Zellen im koronalen Schnitt durch die PT von jeweils drei Tieren pro circadianem Zeitpunkt ausgewertet ($n = 3$). Der graue Balken markiert den subjektiven Tag, der schwarze Balken die subjektive Nacht. * $p < 0,05$ vs. CT10; ** $p < 0,01$ vs. CT10.

3.4 Wirkung von TSH in der Ependymschicht des III. Ventrikels der Maus

Die EC spielt eine wichtige Rolle bei der jahreszeitlichen Steuerung des Reproduktionsverhaltens. Ein wichtiges Enzym ist die Typ2 Triiodothyronin Deiodinase Typ 2 (*Dio2*), die in der EC des Hamsters jahreszeitlich und unter dem Einfluss von Melatonin gesteuert wird (Yasuo et al., 2007). Neueste Untersuchungen in *Coturnix japonica* haben gezeigt, dass *Dio2* durch eine TSH Rezeptor-abhängige cAMP-Signaltransduktionskaskade reguliert wird (Nakao et al., 2008). Wie in Kapitel 3.2.2.6 erstmalig gezeigt, wird *Tshr* auch in der EC von Mäusen exprimiert. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob TSH die *Dio2*-Expression auch in der EC der Maus beeinflusst.

3.4.1 TSH-Stimulation führt zur Phosphorylierung von CREB in der Ependymschicht des III. Ventrikels und der *Pars tuberalis*

Um zu überprüfen, ob TSH Signaltransduktionswege in der EC und der PT der Maus aktivieren kann, wurde zunächst die Wirkung von TSH auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*Ca²⁺/cAMP responsive element-binding protein*; pCREB) in PT/EC-Kulturen untersucht.

In unstimulierten EC-Gewebekulturen (Kontrolle; n = 5) war sowohl in der EC als auch in der PT nur eine schwache basale pCREB-Ir festzustellen (Abb. 40A-C), während die mit TSH stimulierten Präparate (n = 5) eine starke pCREB-Ir aufwiesen (Abb. 40D-F; Abb. 41).

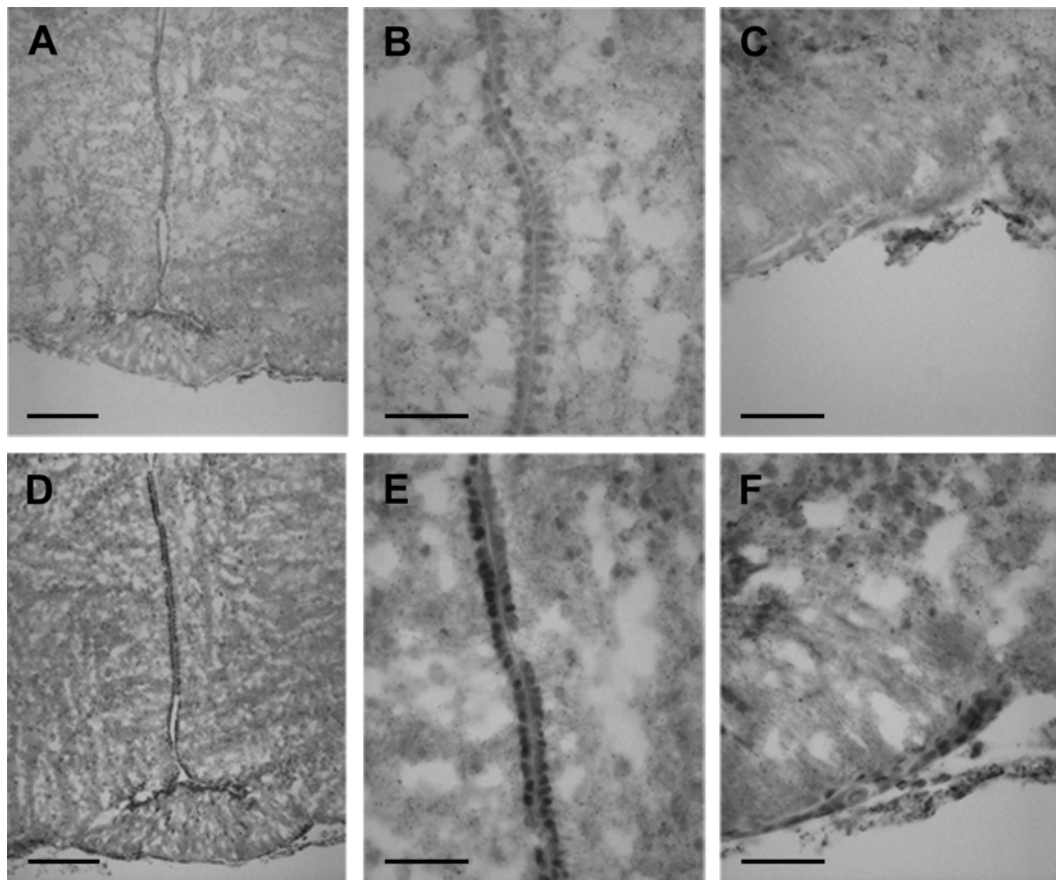


Abb. 40: Zytochemischer Nachweis von phospholyliertem CREB nach TSH-Stimulation in EC-Schnittkulturen der Maus. Maßstab: 100 μ m.

A-C) pCREB-Immunreaktion (pCREB-Ir) in der unstimulierten EC-Gewebekultur.

(A) Übersicht, (B) Ausschnitt aus der EC-Region und (C) aus der PT-Region. In unstimulierten EC-Gewebekulturen ($n = 5$) war eine schwache pCREB-Ir in der EC (B) und in der PT (C) zu beobachten.

D-F) pCREB-Ir in der mit TSH-stimulierten EC-Schnittkultur.

(D) Übersicht, (E) Ausschnitt aus der EC-Region (F) und der PT-Region. Die TSH Stimulation der EC-Gewebekulturen führte zu einer starken pCREB-Ir in der EC (E) und in der PT (F).

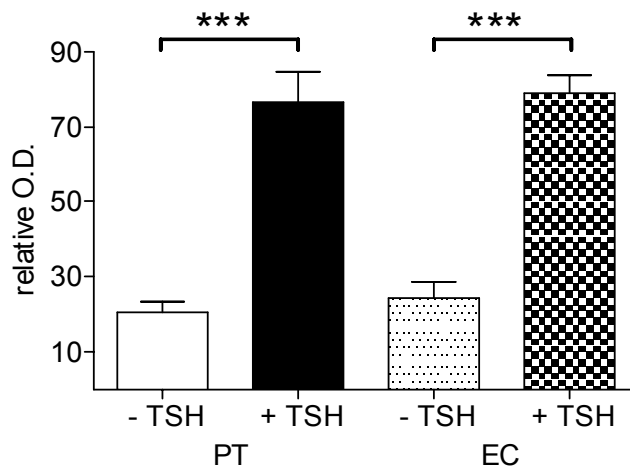


Abb. 41: Effekt der TSH-Stimulation auf die Intensität der pCREB-Immunreaktion in hypothalamischen Schnittkulturen der Maus.

Die Stimulation von EC-Schnittkulturen führte zur Induktion der pCREB-Immunreaktion in der EC und der PT der Maus ($n = 3$; *** $p > 0,001$).

3.4.2 TSH induziert die *Dio2*-Genexpression in der Ependymschicht des III. Ventrikels

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung an TSH-stimulierten EC-Schnittkulturen wurde untersucht, ob TSH die Expression der Typ2 Iodothyronin Deiodinase (*Dio2*) aktiviert. DIO2 wandelt das Prohormon Tetraiodthyronin- (T4) in Triiodthyronin (T3) um, deshalb wurden die T3- und T4-Konzentrationen im Kulturüberstand bestimmt.

Nach Stimulation mit TSH war eine deutliche Induktion der *Dio2*-mRNA in EC-Schnittkulturen von Melatonin-profizienten-Tieren (C3H) im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Schnitten zu beobachten (Abb. 42).

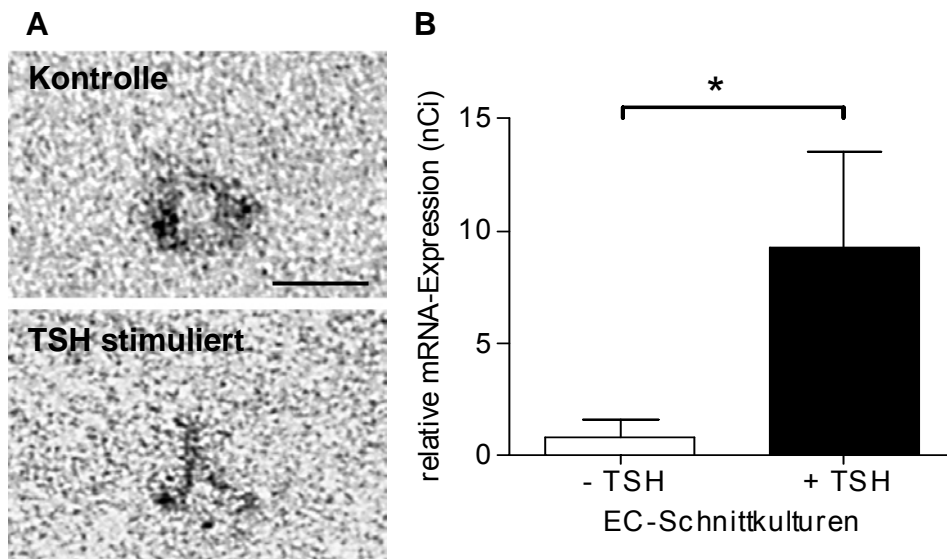


Abb. 42: Expression der *Dio2*-mRNA nach TSH Stimulation in der EC von Melatonin-profizienten C3H-Mäusen.

A) Repräsentatives Autoradiogramm der *Dio2*-Expression in EC-Schnittkulturen. Oben: Kontrolle. Unten: Mit TSH stimulierte EC-Schnittkultur (n = 3; *p > 0,05). Maßstab 300 µm.

B) Induktion der *Dio2*-mRNA nach TSH Stimulation in der EC der Maus.

Die T3- und T4-Konzentrationen im Kulturüberstand der stimulierten EC-Schnittkulturen wurden mit einem direkten Immunoassaysystem bestimmt. In EC-Schnittkulturen stieg die Menge an freigesetztem T3 auf 0,02 ng/ml nach TSH-Stimulation gegenüber der Kontrolle (0,00 ng/ml) an, während T4 in beiden Proben nicht nachweisbar war.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass die Expression einer Reihe von Genen in der PT und der EC der Maus durch Melatonin beeinflusst wird (Tab. 12).

	PT	EC		
<i>Cry1</i>	↑↑	↔		
<i>Tim</i>	↓↓			
<i>Dbp</i>	↓	↓		
<i>Npas4</i>	↑			
<i>Neurod1</i>	↑		↑↑	Melatonin aktiviert akut
<i>Tafa3</i>	↑		↓↓	Melatonin inhibiert akut
<i>Lhb</i>	↓↓	↔	↑	Melatonin aktiviert (Langzeiteffekt)
<i>Tshr</i>	↑↑	↔	↓	Melatonin inhibiert (Langzeiteffekt)
<i>Tshb</i>	↓↓		↔	kein Tag/Nacht Unterschied

Tab.12: Einfluss des Melatonins auf die Genexpression in der *Pars tuberalis* (PT) und der Ependymschicht des III. Ventrikels (EC).

Melatonin beeinflusst auch die Genexpression in verschiedenen Hirnarealen (Tab. 13).

	NA	NH	CA1	CA3	GD
<i>Pomc1</i>	↑↑				
<i>Dbp</i>		↓	↕	↕	↓
<i>Npas4</i>		↔	↓	↔	↓

↑↑ Melatonin aktiviert akut ↕ Tag/Nacht Unterschied
 ↓ Melatonin inhibiert (Langzeiteffekt) ↔ kein Tag/Nacht Unterschied

Tab. 13: Regulation der Genexpression durch Melatonin in verschiedenen Hirnarealen. (NA) Nucleus arcuatus, (NH) Nuclei habenulares, (CA) Cornus ammonis 1 und 3, (GD) Gyrus dentatus.

4 Diskussion

Uhrengene werden in zahlreichen Hirnstrukturen und peripheren Geweben rhythmisch exprimiert (Reppert 1995; Roca et al., 1996; Dubocovich und Markowska 2005; Mühlbauer und Peschke 2007; Richter et al., 2008; Seithikurippu et al., 2008). Grundsätzlich sind periphere Oszillatoren vom zentralen Oszillator im SCN zu unterscheiden. Über die Regulation der circadianen Genexpression in peripheren Oszillatoren ist bislang wenig bekannt. Manche periphere Oszillatoren arbeiten sehr autonom und basieren ausschließlich auf der autoregulatorischen Rückkopplungsschleife der molekularen Uhr, andere Gewebe hingegen sind sehr stark abhängig von rhythmischen Eingangssignalen (Liu und Reppert 2000; Balsalobre 2002; Tousson und Meissl 2004). Zu den stark abhängigen Oszillatoren gehört die hypophysäre *Pars tuberalis* (PT), deren Uhrengeneexpression von der rhythmischen Melatoninsynthese angetrieben wird. Das Hormon Melatonin ist ein wichtiger rhythmischer Botenstoff des circadianen Systems, der dem Organismus die Dunkelphase signalisiert. Die Länge des Melatoninsignals ist ein Maß für die Dauer der Dunkelphase, wodurch diurnale und saisonale Beleuchtungsverhältnisse wiedergegeben werden (Malpaux et al., 2001). Gut charakterisierte Zielgebiete des Melatonins im Gehirn der Nager sind neben der PT der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), der *Nucleus arcuatus* (NA), der *Nucleus dorsomedialis* bzw. *ventromedialis hypothalami* (DMH, VMH) und die Ependymschicht des III. Ventrikels (EC) (Roca et al., 1996; Liu et al., 1997a; Drew et al., 2001; Dubocovich und Markowska 2005) sowie die hippocampalen *Cornu ammonis*-Regionen (CA), der *Gyrus dentatus* (GD) und die *Nuclei habenulares* (NH) (Drew et al., 2001; Savaskan et al., 2002). Die vorliegende Arbeit zeigt, wie sich das Fehlen des Melatoninrezeptors 1a (MT1ko) oder des Uhrengentranslationsprodukts Period1

(PER1ko) auf die rhythmische Genexpression in PT und Gehirn auswirkt. Dadurch wurden grundlegende Erkenntnisse zur Regulation der circadianen Rhythmogenese innerhalb der Hypophyse und des zentralen Nervensystems (ZNS) gewonnen.

Der circadiane Rhythmus des Uhrengens Cryptochrom1 (**Cry1**) in der PT der Maus ist gut charakterisiert. Bekannt ist, dass die rhythmische Expression von *Cry1* in der PT der Maus von einem intakten MT1-Rezeptor abhängt (Jilg et al., 2005) und dass die *Cry1*-Expression durch exogene Melatoninapplikation am Tag in der PT der Ratte induziert werden kann (Dardente et al., 2003, 2007). Daher wurde dieses Gen bei der Suche nach Genen, deren Expression durch Melatonin gesteuert wird, als interne Kontrolle für die Mikroarray-Analyse ausgewählt. Diese Technik und die nachfolgende Validierung mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung zeigten wie erwartet einen Tag/Nacht Unterschied der *Cry1*-Expression im WT, aber nicht in der MT1ko-Maus. Wie bei der Ratte (Dardente et al., 2003) führte die Behandlung mit exogenem Melatonin am Tage auch bei der Maus zu einer starken Induktion der *Cry1*-Expression in der PT. Im Gegensatz zu Befunden, die in der Ratte erhoben wurden (Tischkau et al., 2007), zeigte die *Cry1*-Expression im Hippocampus der Maus jedoch keinen Tag/Nacht Unterschied. Allerdings liegt der Höhepunkt der *Cry1*-Expression im Hippocampus der Ratte in der späten Nacht (Tischkau et al., 2007) und wird daher vom Zeitrahmen dieser Arbeit nicht erfasst. Über die Funktion von Uhrengenen im Hippocampus ist bislang nur sehr wenig bekannt. Möglicherweise beeinflusst das molekulare Uhrwerk im Hippocampus die Sensitivität gegenüber ischämischen Insulten (Tischkau et al., 2007). Wie Versuche mit MT2-defizienten Mäusen gezeigt haben, spielt Melatonin im Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Steuerung von synaptischer Plastizität und Erinnerungsprozessen (Larson et al.,

2006). Jedoch zeigt diese Arbeit in Übereinstimmung mit früheren Studien, dass Melatonin die rhythmische Uhrengenexpression im Hippocampus nicht steuert (Amir et al., 2006). Auch in der EC wird die Expression von *Cry1* offenbar nicht akut durch Melatonin gesteuert. Dies zeigt, dass der Einfluss des Melatonins auf die Uhrengenexpression sehr stark gewebespezifisch ist.

Im Gegensatz zu *Cry1*, das ein echtes Uhrengen darstellt, wird die Rolle von Timeout (***Tim***) im molekularen Uhrwerk der Säugetiere sehr kontrovers diskutiert. Bei *Drosophila*, heterodimerisiert TIM mit PER und schließt somit die negative Rückkopplungsschleife, analog zum negativen Regulatorkomplex (NRC) bei den Säugetieren, der aus PER- und CRY-Proteinen besteht (Bell-Pedersen et al., 2005). Im Jahr 1998 gelang erstmalig die Identifizierung und Klonierung des *Drosophila*-homologen *Tim*-Gens beim Säugetier (Zylka et al., 1998; Sangoram et al., 1998; Takumi et al., 1999). Später wurde allerdings entdeckt, dass das TIMLESS der Säugetiere eine größere Homologie zu einem anderen Fliegenprotein, dem TIMOUT, aufweist (Benna et al., 2000; Gotter et al., 2000, 2006). Darüber hinaus wurden im SCN zwei unterschiedliche *Tim*-Transkripte gefunden (Tischkau et al., 1999), von denen nur eines rhythmisch exprimiert wurde und dessen Translationsprodukt in der Lage war, mit PER zu heterodimerisieren (Takumi et al., 1999; Barnest et al., 2003). Ferner folgt die *Tim*-Expression im SCN keinem eindeutigen Rhythmus, obwohl weniger mRNA-Transkripte in der Mitte des subjektiven Tages (CT05) als zur Mitte der subjektiven Nacht (CT18) nachgewiesen wurden (Zylka et al., 1998). Im Gegensatz zu PER und CRY ist TIM nicht in der Lage, die CLOCK/BMAL1-vermittelte Genexpression zu hemmen (Gotter et al., 2000), und kann daher nicht als echtes Uhrengen angesehen werden. Allerdings spielt TIM eine wichtige Rolle bei der Embryonal-

entwicklung, da TIM-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind. Obwohl *Tim*-mRNA (Zylka et al., 1998) und TIM-Protein (Nuesslein-Hildesheim et al., 2000) in der PT von Maus und Syrischem Hamster deutlich nachweisbar sind, ist die Steuerung der *Tim*-Expression in der PT bisher nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal eine direkte hemmende Wirkung von Melatonin auf die *Tim*-Expression in der PT. DNA-Bindungsstudien können helfen, Zielgene von *Tim* in der PT aufzudecken. Darüber hinaus könnte eine konditionelle *knock out*-Maus Aufschluss über die Funktion von *Tim* im circadianen System geben.

Dbp ist ein sehr gut charakterisiertes Uhrenkontrolliertes Gen. Sowohl im SCN als auch in der Leber wird die rhythmische Expression von *Dbp* durch den CLOCK/BMAL1 Komplex aktiviert und durch den negativen Regulatorkomplex (NRC) aus PER- und CRY-Proteinen gehemmt (Yamaguchi et al., 2000; Ripperger et al., 2006). Darüber hinaus bewirkt DBP eine verstärkte Transkription des *Per1*-Gens im SCN (Yamaguchi et al., 2000; Okamura et al., 2002) durch Bindung an das D-Box-Promotorelement (Dardente et al., 2007). DBP wirkt also direkt als positiver Regulator, indem es gleichzeitig mit dem CLOCK/BMAL1 Komplex an den *Per1*-Promotor bindet (Yamaguchi et al., 2000; Okamura et al., 2002). *Dbp* weist das gleiche Transkriptionsprofil wie *Per1* auf (Yan et al., 2000), ist in der Lage, die rhythmische Transkription von *Per1* zu aktivieren und reguliert dadurch indirekt seine eigene Transkription (Yamaguchi et al., 2000). *Dbp* scheint also ähnlich wie *Bmal1* reguliert zu werden (Guillaumond et al., 2005).

Eine rhythmische *Dbp*-Transkription wurde bislang bei allen untersuchten Geweben wie Leber, Niere, Lunge, Herz, Pankreas und im Gehirn nachgewiesen (Wuarin et al., 1992; Fonjallaz et al., 1996; Lavery et al., 1996; Lopez-Molina et al., 1997; Ripperger et al., 2000; Yan et al., 2000). Unterschiede gibt es aber in der Phasenlage; die rhythmische *Dbp*-

Expression erreicht im SCN ihr Maximum vier Stunden früher als in der Leber (Lopez-Molina et al., 1997). DBP ist ein Transkriptionsfaktor der Par leucin zipper Familie und als solcher ein wichtiges Ausgangssignal der molekularen Uhr. Er reguliert die rhythmische gewebespezifische Genexpression, wie z.B. die circadiane Transkription von Leberspezifischen Genen, welche Enzyme des Stoffwechsels und der Entgiftung kodieren (Mueller et al., 1990; Lavery et al., 1999). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Transkription von *Dbp* sich nicht auf den SCN beschränkt, sondern auch in der PT und in weiteren Kerngebieten des ZNS wie dem NA, VMH, DMH, EC, CA1, CA3, GD und NH vorkommt. Ein Tag/Nacht Unterschied liess sich jedoch nur in SCN, PT, EC, NH und Hippocampus feststellen. Möglicherweise liegt die maximale *Dbp*-Expression in NA, DMH und VMH ausserhalb unseres Zeitrahmens. Um dies zu überprüfen, wäre eine Analyse weiterer Zeitpunkte nötig.

In PT, EC, GD und NH war ähnlich wie im SCN eine stärkere Transkription in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) festzustellen. Interessanterweise zeigten jedoch die CA1- und die CA3-Region ein entgegengesetztes zeitliches Profil: eine schwächere Transkription in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Dies deutet darauf hin, dass der Rhythmus der *Dbp*-Expression in verschiedenen Hirnregionen und selbst innerhalb des Hippocampus unterschiedlich reguliert wird. Obwohl der Tag/Nacht Unterschied der *Dbp*-Expression auch in PT und EC der MT1ko-Mäuse zu erkennen war, zeigte die Applikation des Melatonins, dass das Hormon in diesen Regionen einen hemmenden Einfluss auf die *Dbp*-Expression hat. Dies deutet darauf hin, dass der MT2-Rezeptor diesen Effekt vermitteln könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen sind Versuche mit MT2-defizienten Mäusen notwendig.

Offenbar spielt Melatonin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression in PT und EC, Strukturen, die eine wichtige Rolle bei

saisonalen Veränderungen des Hormonhaushalts einnehmen (Yasuo et al., 2007, Barrett et al., 2007). Aufgrund der eigenen Ergebnisse kann folgendes Modell zur DBP-vermittelten saisonalen Transkription in der PT und der EC der Maus postuliert werden: Unter Langtagbedingungen mit kurzem Melatoninsignal aktiviert DBP die Transkription des *Per1*-Gens durch Bindung an ein D-Box-Element in dessen Promoterregion, wodurch diurnale Abläufe gesteuert werden, während es bei Kurztagbedingungen zur Inhibition der *Dbp*-Expression und damit auch der Proteinsynthese kommt. Dadurch wird gewährleistet, dass die nötigen diurnalen Abläufe nicht unterbrochen werden, aber gleichzeitig der Körper sich auf den nahenden Winter und somit auf die saisonale Veränderungen vorbereiten kann (Abb. 43). Dafür würde auch die Beobachtung sprechen, dass die mRNA-Transkription unter Dauer-Dunkel-Bedingungen (DD) jenen unter Licht-Dunkel-Bedingungen entspricht. Ein Lichtpuls bei Nacht bewirkt keine Induktion der *Dbp*-Expression wie bereits bei *Per1* (Takumi et al., 1999) gezeigt wurde. Licht besitzt folglich keinen Einfluss auf die *Dbp*-Transkription im SCN (Yan et al., 2000). *Dbpko*-Mäuse zeigen im Unterschied zu Mäusen mit einer gezielten Mutation in einem Uhrgenen wie *Clock* (Antoch et al., 1997; King et al., 1997), *Per2* (Zheng et al., 1999), *Bmal1* (Bea et al., 1997) oder *Cry1* und *Cry2* (van der Horst 1999) eine rhythmische, lokomotorische Aktivität unter DD-Bedingungen. Dieses unterstützt die These, dass *Dbp* unabhängig von akuten Lichtreizen, durch die Tageslänge und somit durch Melatonin reguliert wird. Obwohl die untersuchten Labor-Mäusestämme ihr saisonales Fortpflanzungsverhalten verloren scheinen die molekularen Regulationsmechanismen gen-expressiver Vorgänge erhalten geblieben zu sein. Es bietet sich nun an, die duale Rolle des DBP bei der Regulation des saisonalen Verhaltens in der Hamster-PT weiter zu untersuchen, da das reproduktive System des Syrischen Hamsters sehr stark auf eine

Melatonin-kodierte Veränderung der Photoperiode reagiert (Reiter et al., 1980).

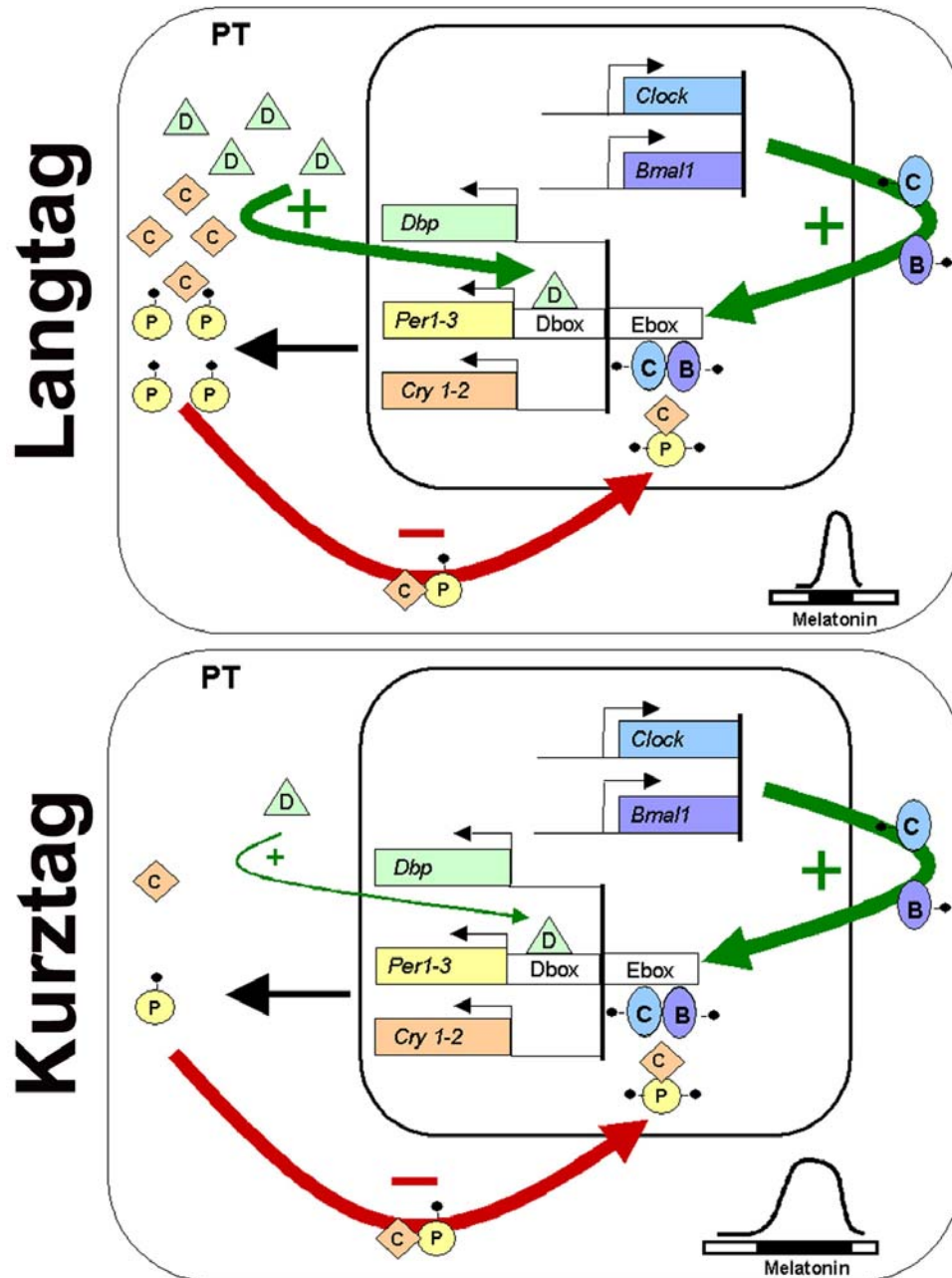


Abb. 43: Hypothetischer Einfluss von DBP auf die photoperiodische Transkription in der PT der Maus.

Unter Langtagbedingungen (oben) mit kurzem Melatoninsignal aktiviert DBP gemeinsam mit dem CLOCK/BMAL1 Komplex die *Per*-Expression, wodurch *Per* verstärkt exprimiert

wird. Unter Kutztagbedingungen (unten) mit langem Melatoninsignal wird *Dbp* vermindert exprimiert und somit auch translatiert, wodurch *Per* ebenfalls vermindert exprimiert wird. Bemerkenswerterweise war der Tag/Nacht Unterschied der *Dbp*-Expression in den NH und im GD der MT1ko-Maus aufgehoben, was auf eine Regulation von *Dbp* in diesen Regionen über den MT1-Rezeptor vermuten lässt. Allerdings scheint dies kein akuter Effekt des Melatonins zu sein, denn eine Behandlung mit exogenem Melatonin führte zu keiner Veränderung der *Dbp*-Expression. Die rhythmische Expression von *Dbp* im SCN ist auch bei Melatonin-defizienten Mäusen vorhanden und somit unabhängig von Melatonin (Lopez-Molina et al., 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben leider keinen Rückschluss auf die Regulation der *Dbp*-Expression in der CA1- und CA3- Region des Hippocampus. Melatonin könnte hier über den MT2-Rezeptor einen langfristigen Effekt auf die *Dbp*-Expression ausüben oder sie ist völlig unabhängig von Melatonin. Versuche mit MT2-defizienten Mäusen könnten hier zur weiteren Klärung beitragen.

Die Funktion der NH ist nicht abschließend geklärt. Vermutlich sind sie Umschaltstation der olfaktorischen Bahnen, die Informationen zwischen Riechhirn und den autonomen Zentren im Hirnstamm vermitteln.

Der Hippocampus spielt nicht nur bei Gedächtnisleistungen eine wichtige Rolle, sondern auch für das Verhalten und bei emotionalen und vegetativen Funktionen. Innerhalb des Hippocampus befindet sich der GD, eine wichtige afferente Struktur (Tepel 2004). Daher könnte die Regulation von DBP über langfristige Effekte des MT1-Rezeptors in diesen beiden Regionen mit endokrinen, viszeralen und emotionalen Zusammenhängen bei der diurnalen Rhythmogenese in Verbindung gebracht werden. Da DBP (Franken et al., 2000, 2007) wie Melatonin (Vollrath et al., 1980) circadiane und homeostatische Aspekte der Schlaf-Regulation vermittelt, könnte die Melatonin-abhängige Hemmung der *Dbp*-Expression im GD

und den NH auch in direktem Zusammenhang mit dem Schlafverhalten stehen.

Darüber hinaus ist DBP ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der Prozesse des Lernens und der Gedächtnisformation sowie der Neuroprotektion im Hippocampus vermittelt (Klugmann et al., 2006).

Die beiden Uhrengenproteine CLOCK und BMAL1 stellen die wichtigsten transkriptionellen Regulatoren der circadianen Rhythmogenese dar (Reppert et al., 2002). Sie gehören der Gruppe der basic Helix-Loop-Helix (bHLH)/PAS (*Per*, *Arnt*, *Sim*) -Familie an. Das neuronale PAS Protein4 (***Npas4***) (Shamloo et al., 2006), auch als LE-PAS (*limbic enriched PAS*) (Moser et al., 2004) oder neuronaler Transkriptionsfaktor (NXF) (Ooe et al., 2004) bekannt besitzt ebenfalls eine konservierte bHLH/PAS-Domäne und ist somit von besonderem Interesse. *Npas4* wird spezifisch im ZNS exprimiert (Moser et al., 2004; Shamloo et al., 2006). Das nukleäre NPAS4-Protein ist in der Lage, mit BMAL1, aber nicht mit CLOCK zu heterodimerisieren (Ooe et al., 2004; Shamloo et al., 2006). Die *Npas4*-Expression stimmt beim Nager teilweise mit der von *Bmal1* überein (Ooe et al., 2004). Folglich könnte *Npas4* über die transkriptionale und translationale Rückkopplungsschleife seine eigene Transkription (Ooe et al., 2004) oder auch die rhythmische Expression von Zielgenen bestimmen. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass *Sim2* den NPAS4/BMAL1 Komplex hemmt (Ooe et al., 2004). Interessanterweise ist das Homologe *Sim*-Gen der Maus wichtig bei der Differenzierung von Zellen der PT (Hoffman et al., 1991; Michaud et al., 1998). *Npas4* spielt auch eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung nach der Geburt, da es erst ab dem embryonalen Tag 17 im Gehirn exprimiert wird (Flood et al., 2004). BHLH-PAS Proteine sind nicht nur wichtig bei der circadianen Rhythmogenese, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der

neuronalen Entwicklung und der Adaption an Hypoxie-induzierten Stress (Taylor et al., 1999; Gu et al., 2000).

Die vorliegende Arbeit zeigt in der PT von WT- und PER1ko-Mäusen eine stärkere *Npas4*-Expression in der Nacht als am Tag. Auffällig ist, dass die *Npas4*-Expression bei der PER1ko-Maus deutlich niedriger ist, obwohl dieser Stamm den gleichen Tag/Nacht Unterschied zeigt wie der WT. Folglich scheint sich das Fehlen des PER1-Proteins auf die basale *Npas4*-Transkription auszuwirken. Eine aktivierende Wirkung von PER1 dürfte auszuschliessen sein, da dann der Tag/Nacht Unterschied in der PER1ko-Maus aufgehoben wäre. Möglicherweise fehlt in der PER1ko-Maus ein die *Npas4*-Expression verstärkendes Element. Die Natur eines solchen Elements ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Die PT von MT1ko-Mäusen zeigt am Tag und in der Nacht eine gleich bleibend niedrige *Npas4*-Expression. Dies könnte auf eine stimulierende Wirkung des Melatonins auf die *Npas4*-Expression in der PT hindeuten.

In den NH und in der hippocampalen CA3-Region war kein Tag/Nacht Unterschied der *Npas4*-Expression festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigte die CA1-Region und der GD des Hippocampus eine deutliche stärkere Expression am Tag als in der Nacht beim WT. Die *Npas4*-Expression zeigt jedoch in CA1 und GD von MT1ko-Mäusen am Tag und in der Nacht eine gleich bleibend hohe *Npas4*-Expression. Im Gegensatz zur Regulation der *Npas4*-Expression in der PT deutet dies auf eine Hemmung der *Npas4*-Expression durch Melatonin in diesen beiden Regionen hin. Allerdings wurden weder die Aktivierung in der PT noch die Hemmung im GD und in den NH durch eine Behandlung mit exogenem Melatonin bestätigt. Möglicherweise sind langfristige Melatoninsignale notwendig, um die *Npas4*-Expression in den entsprechenden Regionen zu regulieren.

Bei Mensch und Maus wird die starke *Npas4*-Expression im Hippocampus und in den NH mit neuronalen Krankheiten, wie z.B. Schlaganfall und

Ischämie oder Down-Syndrom in Verbindung gebracht (Ooe et al., 2004; Flood et al., 2004; Shamloo et al., 2006). Mittlerweile belegen zahlreiche Studien, dass Schlaganfälle verstärkt am Morgen (MEZ 7 Uhr) auftreten (Duez et al., 2008; Kawakami et al., 2008, Foerch et al. 2008). Obwohl dieses zeitliche Muster hauptsächlich auf exogene Faktoren zurückzuführen sein dürften (Foerch et al., 2008), könnte es auch auf der circadianen Kontrolle des kardiovaskulären Systems (Baumgart 1991) beruhen. Möglicherweise ist der Transkriptionsfaktor NPAS4 auch an der circadianen Regulation kognitiver Prozesse beteiligt. Um die Funktion von NPAS4 aufzuklären, ist geplant, NPAS4ko-Mäuse zu generieren. *Npas4* weist eine große Homologie zum *Drosophila* Dysfusion-Gen (*Dys*) auf, welches die tracheale Fusion bei der Fliege vermittelt (Jiang et al., 2003, 2007; Ooe et al., 2007). Allerdings wird es beim Säuger nicht in der Lunge oder in anderen respiratorischen Geweben exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass *Npas4* beim Säugetier eine andere Funktion übernommen hat als bei Arthropoden (Ooe et al., 2004, 2007).

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor Neurodifferentiation1 (***Neurod1***) gehört zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren und ist ein wichtiger Regulator der retinalen/pinealen Entwicklung und Funktion (Morrow et al., 1999; Cau et al., 2003; Pennesi et al., 2003; Akagi et al., 2004; Cho et al., 2004). *Neurod1* wird in endokrinen Zellen von Darm (Mutoh et al., 1997), Pankreas (Naya et al., 1995), Lunge (Neptune et al., 2008), Pinealorgan (Muñoz et al., 2007) und Hypophyse (Poulin et al., 1997) nachgewiesen. *Neurod1* spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuronaler, neuroendokriner und endokriner Strukturen (Bertrand et al., 2002; Neptune et al., 2008). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *Neurod1* im Hippocampus, Cortex, NH und PT, aber nicht im SCN exprimiert wird. Demnach zeigt *Neurod1* ein ähnliches räumliches Expressionsmuster wie *Npas4*. Auch die Regulation der *Neurod1*-

Expression in der PT zeigt einige Parallelen zu *Npas4*. In der PT von WT und PER1ko-Maus war eine stärkere Expression von *Neurod1* in der Nacht als am Tag zu beobachten. Jedoch gab es keinen Unterschied zwischen WT- und PER1ko-Maus. Die MT1ko-Maus zeigt eine gleich bleibend niedrige *Neurod1*-Expression in der PT. Dies deutet auf eine Aktivierung der *Neurod1*-Expression durch Melatonin hin. Allerdings führte auch hier eine Behandlung mit exogenem Melatonin nicht zu einer gesteigerten Expression. Vermutlich sind die Effekte des Melatonins auf die *Neurod1*-Genexpression langfristig.

Interessanterweise wird die *Neurod1*-Expression im Kleinhirn der Ratte durch die Schilddrüsenhormone Tetraiodthyronin (T3) und Tetraiodthyronin (4) reguliert (Chantoux et al., 2002). Demnach scheinen Hormone eine große Rolle bei der Regulation der *Neurod1*-Genexpression zu besitzen.

Neurod1 reguliert über E-Box-Elemente die zellspezifische Hormon-Transkription des gastrointestinalen Sekretins (Mutoh et al., 1997), pankreatischen Insulins (Naya et al., 1995) und hypophysealen POMC1 (Poulin et al., 1997). Die Beteiligung an der Steuerung vielfältiger endokriner Funktionen lässt vermuten, dass *Neurod1* auch an der Regulation der saisonalen Veränderung endokriner Prozessen in der PT beteiligt sein könnte. *Neurod1* könnte an der Regulation des bislang noch nicht identifizierten Prolaktin-freisetzenden Faktors (Morgan 2000; Lincoln et al., 2003, 2005) durch Melatonin in der PT beteiligt sein. Gaudilliere (2004) zeigte, dass NEUROD1 durch die Calmodulin-Kinase II (CaMKII) phosphoryliert wird und dass dieser posttranskriptionelle Mechanismus wichtig für die synaptische Plastizität im Kleinhirn ist. Interessanterweise zeigt die Mikroarray-Analyse, dass *Id1* (*inhibitor of DNA binding and differentiation*) ebenfalls in der PT exprimiert wird. *Id1* ist in verschiedenen Geweben in der Lage, den NEUROD1/E-Protein-E-Box Komplex zu zerstören (Benezra et al., 1990; Ghil et al., 2002). Darüber hinaus wurde

ID1 kürzlich eine wichtige Rolle bei der regulierten Exocytose durch Induktion dabei wichtiger Komponenten zugeschrieben (Ishizuka et al., 2007). Weitere Studien müssen nun klären, wie sich das Fehlen von NEUROD1 auf die Prolaktinspiegel auswirkt.

Eine primäre Antwort des circadianen Systems auf gewohnheitsmäßige, synchronisierte Rhythmen ist die Nahrungsaufnahme (Spiegelmann et al., 2001; Millington 2007). Eine wichtige Region bei der Regulation von Appetit, Nahrungsaufnahme, Körpergewicht und Energiehaushalt ist der *Nucleus arcuatus* (NA; Morton et al., 2006; Meister 2007). Im ZNS wird das Proopiomelanocortin (***Pomc1***) hauptsächlich im NA exprimiert (Smith et al., 1998; Bicknell et al., 2008). Das POMC-Protein wird zu mehreren biologisch aktiven und Gewebe-spezifischen Peptidhormonen wie Melanocyten-stimulierendes Hormon (MSH), adenocorticotrophes Hormon (ACTH) und β -Endorphin (Lowry et al., 1976; Mains et al., 1977; Roberts et al., 1977, 1979; Nakanishi et al., 1979; Kawauchi et al., 1981) gespalten. Die eigenen Daten bestätigen eine starke *Pomc1*-Expression im NA. Allerdings war *Pomc1* nur im NA und nicht wie aufgrund der Mikroarray-Analyse erwartet in PT-Zellen nachweisbar. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei der Lasermikrodissektion (LMD) zur Vermeidung einer RNA-Degradation über die Dauer der LMD nicht einzelne PT-Zellen sondern vielmehr die gesamte PT-Region und somit auch Teile des NA ausgeschnitten wurden. Interessanterweise zeigt der NA des WT und der PER1ko-Maus eine deutlich höhere *Pomc1*-Expression in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18) als in der Mitte des subjektiven Tages (CT06), während in der MT1ko-Maus eine gleich bleibend niedrige Expression zu beobachten ist. Dies könnte auf eine aktivierende Wirkung des Melatonins auf die *Pomc1*-Expression im NA hindeuten, welche durch eine Behandlung mit exogenem Melatonin bestätigt wurde. Dadurch könnte Melatonin sowohl

die diurnalen als auch die saisonalen Veränderungen der Nahrungsaufnahme beeinflussen. Diese Regulation der *Pomc1*-Expression erklärt möglicherweise auch den Einfluss des Melatonins auf die Produktion des beta-Endorphins im NA (Yu et al., 2000).

Da keine *Neurod1*-Expression im NA nachweisbar war (siehe oben), ist NEUROD1 offensichtlich nicht an der Regulation der *Pomc1*-Expression im NA beteiligt. Allerdings weist die Promoterregion von *Pomc1* neben der E-Box eine CRE- (Ca^{2+} /cAMP responsive element) Sequenz auf (Kraus et al., 1995; Jin et al., 1995). Die Aktivierung der MAPK-Signaltransduktionskaskade führt hier zur Phosphorylierung von CREB (Suzuki et al., 1999; Fernandez et al., 2005) und phosphoryliertes CREB könnte die Expression des *Pomc1*-Gens aktivieren. Der MT1-Rezeptor stellt einen Gi/o gekoppelten membranständigen Rezeptor dar, der den cAMP Signalweg beeinflussen kann (Carlson et al., 1989). Darüber hinaus stimuliert Melatonin die Proteinkinase C und ruft eine Phosphorylierung und Aktivierung der Calmodulinkinase (CaM) und der MAPK (*mitogen activated protein kinase*) hervor (Sota-Vega et al., 2004). Das Sättigungshormon Leptin aktiviert ebenfalls JAK2/MAPK (Janus-Kinase2), was zu einer jahreszeitabhängigen Reduktion der Nahrungsaufnahme und der Mobilisierung von Fettreserven führt (Clark et al., 1994; Husar et al., 1997; Fan et al., 1997; Lin et al., 2000; Rousseau et al., 2003). Über diesen Mechanismus könnte Melatonin die *Pomc1*-Expression beeinflussen. Daraus lässt sich das folgende hypothetische Regulationsmodell ableiten: Melatonin moduliert über den MT1-Rezeptor die MAPK-Signaltransduktionskaskade, wodurch pCREB an das CRE-Element im *Pomc1*-Promoter bindet und somit seine rhythmische Genexpression im NA steuert (Abb. 44).

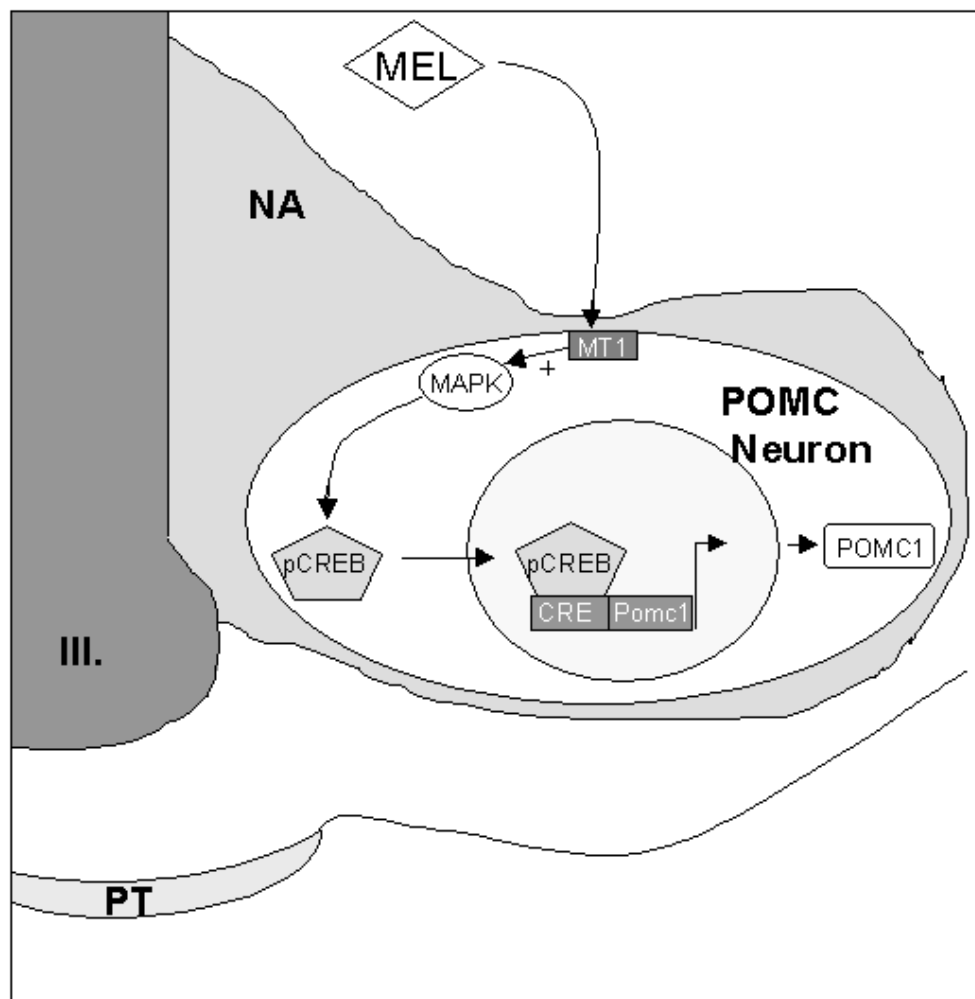


Abb. 44: Hypothetisches Modell der Wirkung des Melatonins auf die *Pomc1*-Transkription in POMC-Neuronen des *Nucleus arcuatus*.

Melatonin (MEL) stimuliert über den Melatoninrezeptor1a (MT1) die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Die MAPK-Signaltransduktionskaskade bewirkt die Phosphorylierung von CREB (*Ca²⁺/cAMP responsive element-binding protein*), das dimerisiert und in den Nukleus des POMC-Neurons wandert. Im Nukleus bindet pCREB an das CRE-Element im *Pomc1*-Promoter, wodurch *Pomc1* rhythmisch exprimiert wird.

Neben *Pomc1* wurde in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit der Literatur eine starke Expression des Östrogenrezeptor-alpha (***Esr1***) im NA gefunden (Lehman et al., 1993; Stefaneanu et al., 1994). Bis 1995 wurde ausschließlich von einem Typ des *Esr* ausgegangen (Kuiper et al., 1996); mittlerweile sind viele *Esr1*- und *Esr2*-Spleißvarianten bekannt (Skipper et al., 1993; Chu et al., 1997; Petersen et al., 1998; Price et al., 2000; Poola et al., 2000; Pak et al., 2007). Unklar bleibt jedoch, ob aus allen Varianten funktionelle Proteine synthetisiert werden können (Matthews 2003). Im Hypothalamus wird der *Esr1* in vielen Zellen des medial-basalen Hypothalamus (MBH) exprimiert, welcher unter anderem den NA und die EM (*Eminentia mediana*), beinhaltet (Lehman et al., 1993; Stefaneanu et al., 1994). Darüber hinaus zeigten Ko-Lokalisationsstudien mit dem luteinisierenden Hormon beta (LHb), dass beide gemeinsam hauptsächlich in den dorso-lateralen Zellen der PT vorkommen (Lehman et al., 1993). Das Vorkommen von *Esr*-Isoformen in der PT wird jedoch kontrovers diskutiert (Greco et al., 2001). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *Esr1* nicht homogen in der PT, sondern vielmehr im NA exprimiert wird. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne dorso-laterale PT Zellen *Esr1* exprimieren. Im NA von WT und PER1ko-Mäusen war kein Tag/Nacht Unterschied der *Esr1*-Expression festzustellen, während die Expression bei MT1ko-Mäusen am Tag signifikant höher war als in der Nacht. Das Fehlen des MT1-Rezeptors könnte sich also aktivierend auf die *Esr1*-Expression bei Tag auszuwirken. Möglicherweise beeinflusst Melatonin indirekt die Genexpression von *Esr1* im NA. Interessanterweise wird die Expression von *Esr*-beta in verschiedenen **peripheren** Geweben durch das molekulare Uhrwerk gesteuert (Cai et al., 2008), es gibt aber einige Hinweise darauf, dass Melatonin an der Regulation von **zentralen** Östrogenrezeptoren beteiligt ist. So zeigen ovariectomierte Ratten nach Melatoninapplikation am Tag eine verminderte Anzahl an

Östrogenrezeptoren im Gehirn (Roy et al., 1981). Im Gegensatz dazu zeigen Schafe keinen signifikanten Unterschied im ESR-Gehalt im NA, wenn sie unter Kurztag- mit langem Melatoninsignal oder unter Langtag- mit kurzem Melatoninsignal Bedingungen gehalten wurden (Skinner et al., 1997). Daher sind weitere Untersuchungen, wie z.B. Pinealektomie nötig, um eine Wirkung des Melatonins auf die *Ers1*-Expression im NA festzustellen.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass ein erniedrigter nächtlicher Melatoningehalt mit dem gehäuften Vorkommen von Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs korreliert (Tarmarkin et al., 1982; Danforth et al., 1985), was auf eine tumorsuppressive Wirkung des Melatonins hinweist.

Die saisonalen Effekte des Melatonins werden wahrscheinlich über den MT1-Rezeptor in der PT vermittelt (Morgan et al., 2000). Melatonin moduliert über einen bislang noch nicht identifizierten Faktor namens „Tuberalin“ (Stirland et al., 2001) die Prolaktinfreisetzung in der PD (Morgan et al., 2000; Lincoln et al., 2003). Bislang sind jedoch alle Bestrebungen gescheitert, diesen Prolaktin-freisetzenden Faktor zu identifizieren (Morgan et al., 2000; Lincoln et al., 2003). Im Hinblick darauf erscheint es von besonderem Interesse, dass die Mikroarray-Analyse ein Rikengen (7530404M11Rik) mit unbekannter Funktion zeigte, dessen Expression in der PT der Maus offenbar durch Melatonin gehemmt wird. Dieses Rikengen kodiert eine kleine sekretorische Protein-Familie namens TAFA mit konservierten Cysteinresten, das bislang nur mit Hilfe der Computer-gestützten Bioinformatik beim Menschen und der Maus ermittelt wurde (Tang et al., 2004). Das in dieser Arbeit ermittelte Rikengen ist homolog zu **Tafa3** und wird unter allen bisher untersuchten Geweben wie Lunge, Niere, Herz, Leber, und Milz ausschließlich im Gehirn exprimiert (Tang et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *Tafa3* sehr stark in der PT, aber nicht im SCN exprimiert wird. Jedoch wurde die hemmende Wirkung von Melatonin auf die *Tafa3*-Expression weder durch die *in situ*-Hybridisierung noch durch die Melatoninapplikation bestätigt. Die *Tafa3*-Expression ist im WT in der Nacht stärker als am Tag und in der MT1ko-Maus gleichbleibend niedrig. Dies deutet eher auf eine aktivierende Rolle des Melatonins hin, die jedoch nicht akut ist, da exogenes Melatonin keinen Einfluss auf die *Tafa3*-Expression hat. Ähnlich wie für *Npas4* beschrieben zeigt auch die PER1ko-Maus den gleichen Tag/Nacht Unterschied wie der WT, obwohl hier die *Tafa3*-Expression insgesamt deutlich niedriger ist. Möglicherweise fehlt in der PER1ko-Maus ein verstärkendes Element, das sich sowohl auf die *Npas4* als auch die *Tafa3*-Expression auswirkt.

In Hypothalamus, Hippocampus oder in den NH war kein Tag/Nacht Unterschied der *Tafa3*-Expression festzustellen. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, dass ein Expressionsmaximum ausserhalb unseres Zeitrahmens liegt oder dass *Tafa3* in diesen Strukturen nicht rhythmisch exprimiert wird.

Die Regulation der *Tafa3*-Expression in der PT legt nahe, dass dieses kleine sekretorische Protein eine wichtige Rolle bei der Übermittlung saisonaler Beleuchtungsverhältnisse einnehmen könnte. Um diese Rolle aufzuklären, ist geplant *Tafa3*-Bindungsstudien durchzuführen, um Zielgebiete von *Tafa3* darzustellen. Mit Hilfe *Tafa3*-spezifischer Antikörper soll die Lokalisation und auch die rhythmische Synthese des Proteins in Hypophyse und ZNS überprüft werden. Darüber hinaus soll eine Stimulation von PD-Kulturen mit TAFA3 zeigen, ob das Protein in der Lage ist, die Prolaktinfreisetzung zu stimulieren.

Bei Säugetieren vermittelt das Hormon Melatonin jahreszeitliche Veränderungen in der Photoperiode (Tageslänge, Lichtphase) und ermöglicht somit eine saisonale Anpassung (Goldman et al., 2001; Wagner et al., 2007). Die Jahreszeit-abhängige Fortpflanzung saisonaler Säugetiere wird über endokrine Zellen des Hypothalamus, der Adenohypophyse und der Gonaden moduliert (Ferris et al., 2006). Dabei ist die Synthese und Freisetzung von gonadotropen Hormonen, wie z. B. des lutenisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) entscheidend für die normale Reproduktion (Ferris et al., 2006). Die hypophysären Glykoproteine LH, FSH und Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) weisen die identische Alpha-Untereinheit auf, während die Spezifität des jeweiligen Hormons durch die beta-Untereinheit bestimmt wird (Pierce et al., 1981; Policastro et al., 1986). LH, FSH und TSH kommen nicht nur in der Adenohypophyse, sondern auch in den PD-ähnlichen Zellen der PT vor (Böckers et al., 1997). Obwohl einige Studien auf eine Melatonin-abhängige Steuerung hindeuten fehlt bislang der direkte Beweis, und es ist wenig über die Rolle dieser Hormone in der PT bekannt. Daher wurde mit Hilfe der Mikroarray-Technologie mit MT1ko- und WT-Mäusen untersucht, ob Melatonin die Genexpression von *Lhb*, *Fshb* und/oder *Tshb* in der PT beeinflusst.

Die Analyse der Biochips vom WT ergab eine deutlich schwächere ***Lhb***-Transkription in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Demgegenüber zeigte die MT1ko-Maus eine gleich bleibend hohe *Lhb*-Expression. Da bei MT1ko-Mäusen nur geringe Mengen an PER und CRY vorhanden sind (Jilg et al., 2005), könnte dies auf eine Hemmung der *Lhb*-Transkription durch den NRC (PER/CRY Komplex) in der PT hindeuten. Eine Aktivierung der *Lhb*-Expression durch Melatonin ist auszuschließen, da in diesem Fall eine schwächere Expression in MT1ko-Mäusen zu erwarten wäre. Tatsächlich führt das Fehlen rhythmischer PER1-Proteinschwankungen in den

PER1ko-Mäusen offenbar zu einer erhöhten Transkription am Tag (CT06) und zu einer erniedrigten Expression in der Nacht (CT18). Dies weist darauf hin, dass Melatonin einen zusätzlichen hemmenden Effekt auf die *Lhb*-Expression in der PT der PER1ko-Maus ausüben könnte. Tatsächlich führt eine Behandlung mit exogenem Melatonin am Tage zu einer Hemmung der *Lhb*-Expression in der PT. Folglich dürfte sowohl PER1 als auch Melatonin hemmend auf die *Lhb*-Expression in der PT der Maus wirken. Möglicherweise hilft der direkte Einfluss des Melatonins dazu, unterschiedliche Stimuli zu verhindern oder aufzuheben, wie dies bereits aufgrund von Studien an Schafen vermutet wurde (Hazlerigg et al., 1991; McNulty et al., 1994). Da Melatonin die *Dbp*-Expression in der PT hemmt und DBP die *Per1*-Expression verstärkt (Abb. 42), wird unter Kurztagbedingungen mit hohem Melatoninspiegel letztlich die Hemmung der *Lhb*-Expression in der PT durch PER1 aufgehoben und Melatonin wirkt allein hemmend (Arendt et al., 1983; Bittman et al., 1983; Karsch et al., 1984; Misztal et al., 2007). Dadurch könnte eine sehr fein abgestufte saisonale Regulation der *Lhb*-Expression in der PT ermöglicht werden. Darüber hinaus hemmt Melatonin auch die GnRH-induzierte Freisetzung von LH aus der PT (Skinner et al., 1997). Allerdings scheint die LH-Freisetzung durch Melatonin in anderen Regionen des MBH und nicht direkt in der PT reguliert zu werden (Malpaux et al., 1994, 1995). Das aus der PT freigesetzte LH hemmt wiederum die LHRH-Freisetzung an Nervenendigungen in der *Eminentia mediana* und auf diesem Wege dürfte Melatonin über die cAMP-Signaltransduktionskaskade die *Lhb*-Transkription in der PT beeinflussen (Nakazawa et al., 1991).

Eine neue Studie zeigt, dass bei CLOCK-defizienten Mäusen eine intracerebroventriculäre Injektion mit Arginin-Vasopressin (AVP) die LH-Freisetzung stimuliert, die Gabe des AVP-Rezeptor1-Antagonisten [(decamino-Pen, O-Met-Tyr, Arg)-Vasopressin] jedoch die endogene LH-Freisetzung in der PT von Wildtyptieren nicht beeinflusste (Miller et al.,

2006). Dies bestätigt die eigenen Beobachtungen, dass PER1 die *Lhb*-Expression in der PT hemmt. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine *in vitro* Stimulation mit GnRH die *Lhb*-Genexpression beeinflusst (Fallest et al., 1995) und eine hohe Pulsfrequenz von GnRH zur verstärkten LH-Freisetzung führt (Misztal et al., 2007). Eine kurze Melatonin-Administration im ZNS des Schafes führte jedoch nicht zur Stimulation von GnRH und LH-Freisetzung aus der PT (Romanowicz et al., 2001). Folglich scheint die *Lhb*-Expression von vielen Faktoren beeinflusst zu werden, die in engem Zusammenhang mit der saisonalen Reproduktion stehen. Die eigenen Daten zeigen erstmalig, dass sowohl PER1 als auch Melatonin die *Lhb*-Expression in der PT direkt inhibieren können.

Lhb wird auch in der EC exprimiert, hier war jedoch kein Tag/Nacht Unterschied zu beobachten. Auch die Behandlung mit exogenem Melatonin zeigte hier keinen Effekt, jedoch werden in dieser Region keine Melatoninrezeptoren exprimiert (Drew et al., 2001; Barrett et al., 2006). Folglich scheinen hier andere Faktoren die *Lhb*-Transkription zu regulieren. Denkbar wäre eine Steuerung über das LH-freisetzende Hormon (LHRH), das in neuronalen Endigungen in den Tanycyten des III. Ventrikels und in PT-Zellen nachgewiesen wurde (Naik et al., 1975; Dellman et al., 1974; Kurita et al., 2004; Mabuchi et al., 2004; Shirasawa et al., 2007). Interessanterweise konnte Shirasawa (2007) die LHRH-Endigungen hauptsächlich im dorsolateralen Bereich der PT, wo hauptsächlich PD-ähnliche Zellen vorhanden sind (Gross 1984; Kameda et al., 1990), lokalisieren. Auch die eigenen Beobachtungen zeigen eine verstärkte *Lhb*-mRNA Expression in der dorsolateralen-Region der PT der Maus, während in der PT des Schafes scheinbar eine homogene *Lhb*-Expression vorhanden zu sein scheint (Pelletier 1992; Böckers et al., 1996).

Neben *Lhb* wird auch ***Fshb*** in den PD-ähnlichen Zellen der PT exprimiert (Böckers et al., 1997). Beide Hormone sind zentrale Regulatoren der Steroid- und Gametenbildung (Kumar et al., 2007) und weisen eine erhöhte Hormonkonzentration in der Zirkulation bei Nacht auf (Nequin et al., 1979; Woodruff et al., 1996; Tejada et al., 1998; Huang et al., 2001; Ahn et al., 2004). Auch die Mikroarray-Analyse zeigte beim WT eine signifikant schwächere *Fshb*-Expression in der Mitte des subjektiven Tages (CT06) als in der Mitte der subjektiven Nacht (CT18). Demgegenüber zeigte die MT1ko-Maus eine gleich bleibend hohe *Fshb*-Expression. Da bei MT1ko-Mäusen nur geringe Mengen an PER und CRY vorhanden sind (Jilg et al., 2005), könnte dies auf eine Hemmung der *Fshb*-Transkription durch den NRC in der PT hindeuten. Die *in situ*-Hybridisierung zeigte jedoch bei den MT1ko- und PER1ko-Mäusen das gleiche Expressionsprofil wie der WT, mit einer stärkeren *Fshb*-Expression zum Zeitpunkt CT18. Die Mikroarray-Analyse ließ sich also durch die *in situ*-Hybridisierung nicht bestätigen. Als Erklärung für die Mikroarray-Ergebnisse könnten experimentell bedingte Verunreinigungen in Frage kommen. Diese diskrepanten Ergebnisse bestätigen die Notwendigkeit einer Validierung der Ergebnisse aus der Mikroarray-Analyse mit der *in situ*-Hybridisierung (Duffield et al., 2003).

Offenbar werden die Tag/Nacht Schwankungen der *Fshb*-mRNA Menge in der PT der Maus unabhängig von einem über den MT1-Rezeptor vermittelten Melatoninsignal und auch unabhängig von der molekularen Uhr gesteuert, da alle Uhrengene bei den MT1ko-Mäusen stark reduziert sind (Jilg et al. 2005). Ob Melatonin die *Fshb*-Transkription in der PT über den MT2-Rezeptor beeinflusst, ist bislang nicht geklärt. Bei Schafen führt eine Melatonin-Mikro-Implantation in die PT langfristig zu einer verminderten Plasma FSH-Konzentration und zu einer Regression der Hoden (Lincoln 1994). Möglicherweise wird dieser Effekt über den MT2-

Rezeptor vermittelt. Um dies zu überprüfen, sind entsprechende Experimente mit MT2-defizienten Mäusen geplant.

Ein Vergleich des Expressionsprofils von PD-Gewebe der in dieser Arbeit verwendeten Mäusestämme dürfte Hinweise darauf liefern, ob die *Fshb*-Expression in der PT den gleichen Steuerungsmechanismen unterliegt wie in der PD und den Ovarien. Activin aktiviert und Inhibin hemmt die *Fshb*-Transkription und die damit einhergehende FSH-Freisetzung aus der PD und den Ovarien (Carroll et al., 1989; Weiss et al., 1995; Bilezikjian et al., 2004; Gregory et al., 2004). Es erscheint deshalb interessant, mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und/oder Immunzytochemie zu überprüfen, ob diese Regulatoren auch in der PT vorkommen.

Im Gegensatz zu *Lhb* und *Fshb*, die nur in den PD-ähnlichen Zellen der PT exprimiert werden, wird ***Tshb*** in der PT ausschließlich von den PT-spezifischen Zellen exprimiert (Wittkowski et al., 1988; Bockmann et al., 1993, 1997). Obwohl bei der Mikroarray-Analyse kein Tag/Nacht Unterschied der *Tshb*-mRNA-Spiegel festzustellen war, zeigte die Quantifizierung der *in situ*-Hybridisierung ein ähnliches Expressionsmuster wie für *Lhb* beschrieben. Beim WT war die *Tshb*-Transkription am Tag (CT06) deutlich schwächer als in der Nacht (CT18), während die MT1ko-Mäuse eine gleich bleibend starke *Tshb*-Expression zeigten. Da bei MT1ko-Mäusen nur geringe Mengen an PER und CRY vorhanden sind (Jilg et al., 2005) könnte dies auf eine Hemmung der *Tshb*-Transkription durch den NRC (PER/CRY Komplex) in der PT hindeuten. Eine Aktivierung durch Melatonin über den MT1-Rezeptor ist unwahrscheinlich, da die Expression in MT1ko-Mäusen nicht abgeschwächt war. Erwartungsgemäß führte das Fehlen rhythmischer Schwankungen im PER1-Spiegel in den PER1ko-Mäusen zu einer stärkeren *Tshb*-Transkription am Tag (CT06). Jedoch war bei diesen Mäusen eine

erniedrigte *Tshb*-Expression in der Nacht (CT18) zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass Melatonin einen zusätzlich hemmenden Effekt auf die *Tshb*-Expression in der PT der PER1ko-Maus ausüben könnte. Tatsächlich führte eine Gabe von exogenem Melatonin am Tage zu einer Hemmung der *Tshb*-Expression in der PT der Maus. Folglich wirkt sowohl PER1 als auch Melatonin hemmend auf die *Tshb*-Expression in der PT der Maus. Möglicherweise dient der direkte Einfluss des Melatonins dazu, unterschiedliche Stimuli zu verhindern oder aufzuheben. Die im Vergleich zum WT deutlich abgeschwächte Expression von *Tshb* in der PER1ko-Maus in der Mitte der Nacht kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die PER1ko-Mäuse zum Zeitpunkt CT18 deutlich höhere Plasma-Melatoninwerte aufweisen (Persönliche Mitteilung von Charlotte von Gall). Viele frühere Studien deuten darauf hin, dass Melatonin die *Tshb*-Expression in der PT bei Schafen und Nagetieren hemmt (Böckers et al., 1995; Bockmann et al., 1996; Sakamoto et al., 2000; Dardente et al., 2003, 2007; Aizawa et al., 2007) jedoch fehlte bislang der Nachweis, dass endogenes Melatonin inhibitorisch auf die *Tshb*-Expression wirkt (Dardente et al., 2007; Aizawa et al., 2007). Die eigenen Beobachtungen legen eine hemmende Wirkung des endogenen Melatonins (vermittelt über den MT1-Rezeptor) auf die *Tshb*-Expression nahe und zeigen darüber hinaus auch einen starken Einfluss des molekularen Uhrwerks auf die *Tshb*-Expression (Abb. 44A).

Untersuchungen zur *Tshb*-Transkription und TSHb-Immunreaktion in der PT der Ratte (Aizawa et al., 2007) zeigten eine stärker *Tshb*-Expression in der Nacht im Vergleich zum Tag. Die TSHb-Immunreaktion war jedoch lediglich in der frühen Taghälfte erniedrigt. Auch diese Arbeit berichtet eine hemmende Wirkung von exogenem Melatonin auf die *Tshb*-Expression. Allerdings führte auch eine Pinealektomie zu einer Abnahme der *Tshb*-Expression. Um diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären, postulierten Aizawa et al. (2007) einen Einfluss der molekularen Uhr auf die *Tshb*-Expression. Da die Uhrengenenexpression in der PT reduziert ist (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002), werden Gene, deren Expression durch die molekulare Uhr gesteuert werden, ebenfalls herab reguliert. Ein aktives E-Box-Element ist zwar in der alpha-Untereinheit des *Tsh*-Promoters nachgewiesen (Jackson et al., 1995; Wood et al., 1999), aber bislang für *Tshb* nicht gezeigt. Die eigenen Daten zu rhythmischen Schwankungen der TSH-Immunreaktion (Ir) in der PT decken sich weitgehend mit den Befunden von Aizawa (2007). Auch in der PT der WT-Maus war die TSH-Ir in der Mitte des Tages gering. In der PT der MT1ko-Mäuse war die TSH-Ir erwartungsgemäß bei Tag und Nacht gleich bleibend hoch und in den PER1ko-Mäusen war sie in der Nacht niedriger als am Tage.

Bemerkenswerterweise kann der *Tsh*-Rezeptor (*Tshr*) die *Tshb*-Expression negativ beeinflussen und *vice versa* (Lalli et al., 1995). Bisher ist der Nachweis des *Tshr* in der PT von Säugetieren allerdings noch nicht gelungen. Die vorliegende Arbeit zeigt ein erstes Mal das Vorkommen des *Tshr* in der PT und der EC bei Säugetieren. Neueste Untersuchungen in der japanischen Wachtel (*Coturnix japonica*) haben gezeigt, dass *Dio2* in der EC durch eine TSH Rezeptor-abhängige cAMP-Signaltransduktionskaskade in der EC gesteuert wird (Nakao et al., 2008). Beim Hamster wird die *Dio2*-Expression in der EC durch Melatonin gesteuert (Yasuo et al., 2007). Das Enzym DIO2 katalysiert die Umwandlung von T4 zu T3. T3 als

wichtiger Regulator bei photoperiodisch induziertem Hodenwachstum in der japanischen Wachtel (Yoshimura et al., 2003). Offenbar verändert T3 die Morphologie der Endfüße (Terminalien) der Tanyzyten der EC, so dass sie die Freisetzung von GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) aus den Nervenendigungen der GnRH-Neurone in der *Eminentia Mediana* regulieren können (Yamamura et al., 2006). Die eigenen Daten zeigen zum ersten Mal im Säugetier, dass eine Stimulation von Schnittkulturen mit TSH die Phosphorylierung von CREB in der EC und in der PT induziert. Nach Applikation von TSH an Schnittkulturen des mediobasalen Hypothalamus (MBH) waren in der EC eine *Dio2*-Induktion und im Kulturüberstand ein erhöhter T3-Gehalt nachweisbar. Dies unterstützt die Hypothese, dass der *Tshr* in der EC der Maus auf Stimulation mit TSH in der gleichen Weise antwortet wie der in der Wachtel.

In der PT könnte TSH über die Aktivierung von pCREB zu einer gesteigerten *Per1*-Expression führen und so in einer negativen Rückkopplungsschleife seine eigene Expression hemmen. Diese negative Rückkopplungsschleife ließe vermuten, dass die *Tshb*-Expression durch eine Langzeitdesensitivierung reguliert wird, um dadurch exzessive Hormonproduktion zu vermeiden (Lalli et al., 1995).

Der intrazelluläre Aktivator *Pit1* (*pituitary-specific transcription factor*) oder andere TSH-regulierende Rezeptoren, wie TRHR (*thyroid releasing hormone receptor*) sind bislang in der PT nicht nachgewiesen (Sakai et al., 1999), so dass die Steuerung der TSH-Freisetzung aus der PT anders ablaufen dürfte als aus der PD. Interessanterweise wird die Expression von *Tshr* in der PT aber nicht in der EC durch endogenes und exogenes Melatonin aktiviert (Abb. 44B). Diese Regulation erlaubt vermutlich eine jahreszeitlich abgestimmte Funktion des *Tshr* in der PT.

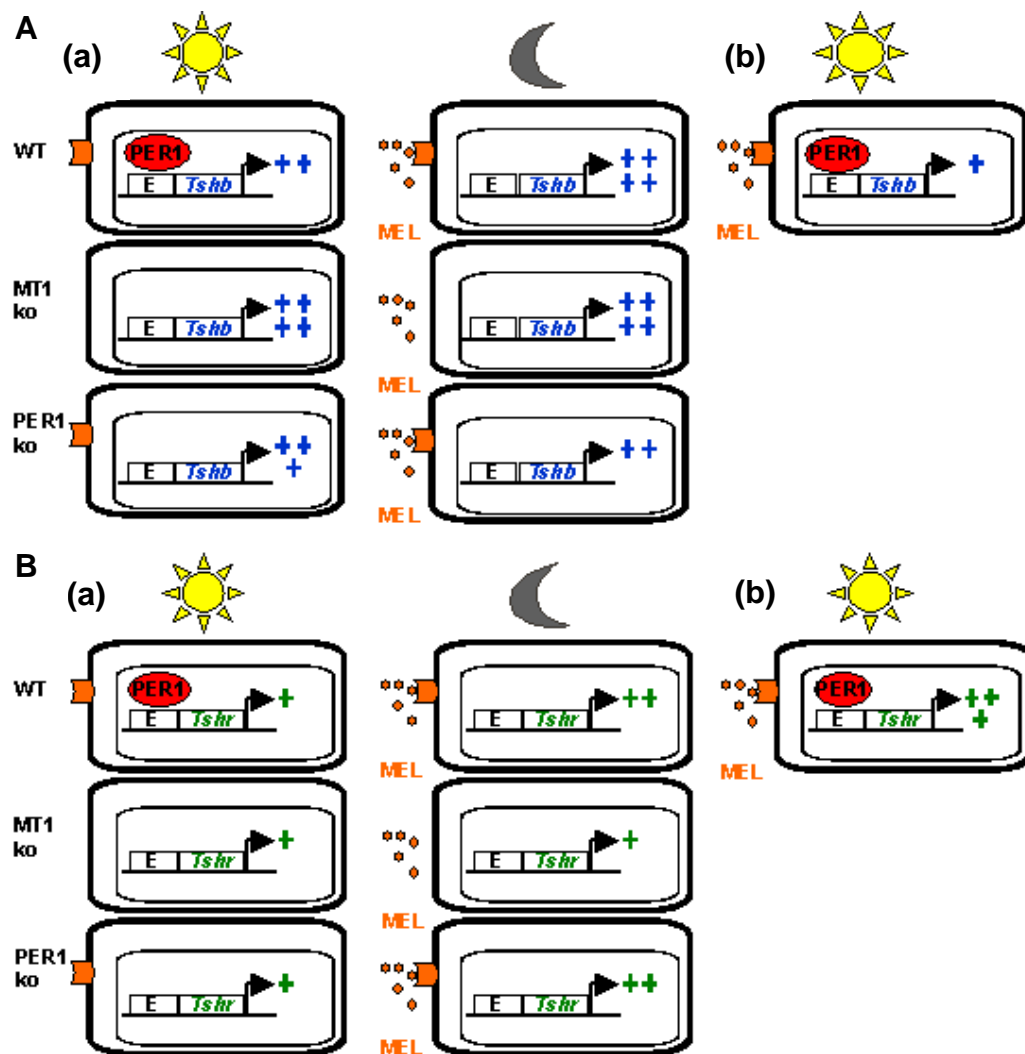


Abb. 44: Schema der *Tshb*- und *Tshr*-Expression im Tag/Nacht Vergleich von WT-MT1ko- und PER1ko-Mäusen in der PT der Maus.

A) Im WT ist die *Tshb*-Expression in der PT gering, wenn der Gehalt an PER1 sein Maximum erreicht (a, oben) und *vice versa*; dieses legt eine hemmende Wirkung von PER1 auf die *Tshb*-Expression nahe. Versuche mit PER1ko-Mäusen (a, unten) und WT die mit exogenem Melatonin behandelt wurden (b), legen nahe, dass die *Tshb*-Expression zusätzlich durch Melatonin gehemmt wird. B) Die *Tshr*-Expression ist am stärksten bei Nacht mit hohem Melatoniningehalt in der PT des Wildtyps (a, oben). Eine Behandlung mit exogenem Melatonin induzierte die *Tshr*-Expression in der PT (b). Die angenommene Aktivierung der *Tshr*-Expression durch Melatonin ist unabhängig von PER1, da die PER1ko-Mäuse (a, unten) ein ähnliches Expressionsmuster haben wie der WT.

Die TSH-produzierenden PT-spezifischen Zellen bilden nur einen kleinen Teil der TSH-produzierenden Zellen in der Gesamthypophyse aus, so dass man bislang davon ausging, dass die jahreszeitlich bedingte Hemmung der *Tshb*-Synthese und -Freisetzung einen äußerst begrenzten Effekt auf die Gesamt-Hypophysen TSH-Sekretion ausübt (Dardente 2007). Jedoch schliessen die neueren Studien die Möglichkeit von „Sommer“- und „Winter“-Prolaktin-freisetzenden Zellen in der PD nicht aus (Dupré et al., 2007). Beim photoperiodischen Hamster wurde gezeigt, dass unter Kurztagbedingungen (KT) mit langem Melatoninsignal sowohl die alpha- und beta-Untereinheit der *Tsh*- als auch die *MT1*-mRNA drastisch reduziert ist (Dardente et al., 2003, 2007). Beim Hamster und Ratte wurde auch gezeigt, dass die PT-spezifischen Zellen die einzigen Zellen in der PT sind, welche den MT1-Rezeptor exprimieren (Klosen et al., 2002; Dardente et al., 2003). Diese Daten führen zu der Annahme, dass die *Tshb*-exprimierenden Zellen der PT als Kalenderzellen (Dupré et al., 2007) die jahreszeitlichen Beleuchtungsverhältnisse durch das Melatoninsignal dekodieren und über den MBH an die PD weitergeben (Nakao et al., 2008a, 2008b). Folgendes hypothetisches Modell der photoperiodischen Regulation der saisonalen Reproduktion wäre bei Nagetieren denkbar:

Unter Langtagbedingungen ist die Melatoninkonzentration gering und dieses führt zu einer geringen Aktivierung der *Tshr*-Expression in der PT. Es stehen daher nur wenige TSHR zur parakrinen Aktivierung zur Verfügung, deshalb wird der cAMP/pCREB/PER1 Signaltransduktionsweg weniger aktiviert. Die *Tshb*-Expression wird nur geringfügig gehemmt, da im Langtag nur wenig Melatonin und wenig PER1 vorhanden ist. Die TSH Synthese wird aber aktiviert. TSH diffundiert aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft zur EC und aktiviert dort über TSHR/pCREB die *Dio2*-Expression, wodurch es zur verstärkten T₃-Umsetzung und -Freisetzung kommt. T₃ sorgt dafür, dass mehr GnRH aus den

entsprechenden neuronalen Endungen freigesetzt und somit das Gonadenwachstum angeregt wird.

Unter Kurztagbedingungen wird mehr Melatonin produziert und dadurch mehr TSHR synthetisiert. Höhere Spiegel von PER1 und Melatonin führen zu einer verstärkten Hemmung der rhythmischen *Tshb*-Expression, die zur verminderten TSH-Freisetzung aus der PT führt. Dadurch kommt es zu einer stark verminderten T3-Freisetzung aus der EC und zu einer geringeren Freisetzung von GnRH, die zu einer Hemmung des Gonadenwachstums führt. Folglich wäre TSH als entscheidendes Signal für photoperiodische Veränderungen der Fortpflanzungstätigkeit anzusehen. Jedoch gibt dieses Modell keinen Aufschluss darüber, wie Melatonin die saisonale Prolaktinfreisetzung reguliert, da die Existenz von „Tuberalin“ immer noch nicht geklärt ist.

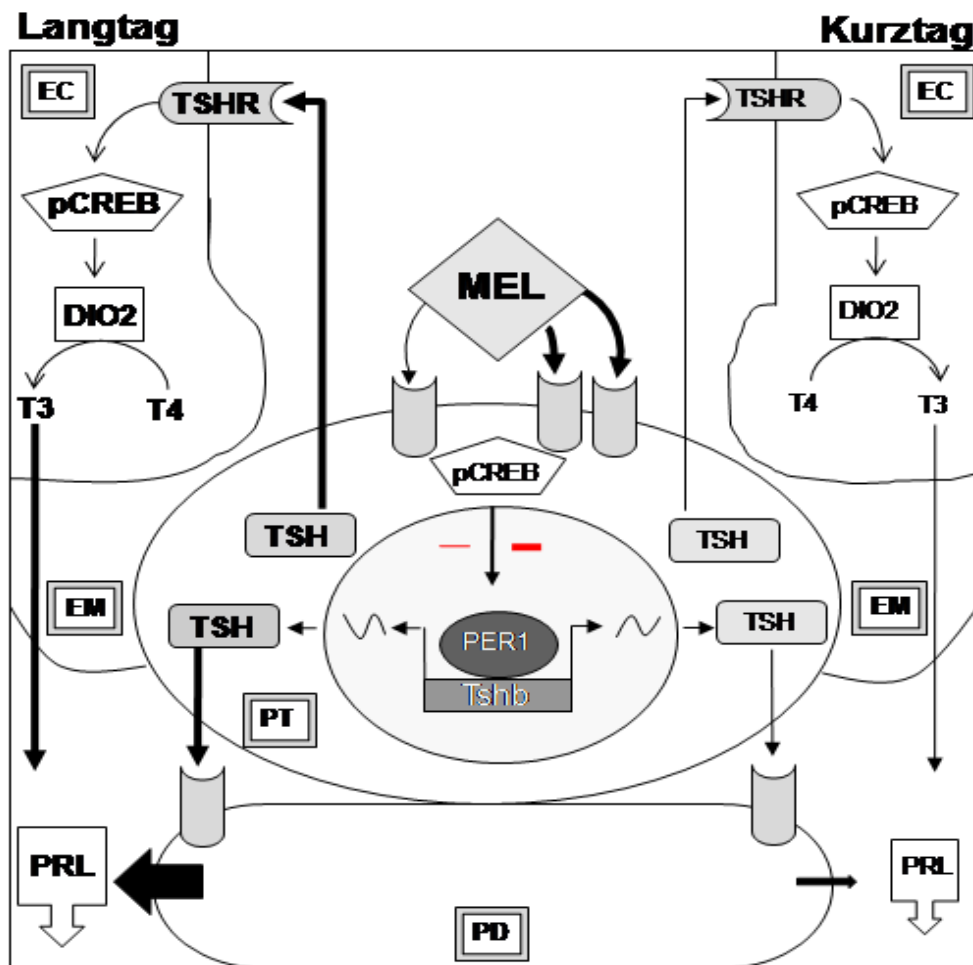


Abb. 45: Hypothetischer Einfluss des TSH aus der PT auf die saisonale Fortpflanzung. Unter Langtagbedingungen werden durch den geringen Melatoninspiegel nur wenige TSHR und deshalb auch die cAMP/pCREB-Signaltransduktionskaskade in der PT gering aktiviert. Dies führt zur verminderten PER1-Synthese, wodurch die Tshb-Expression und somit die TSH-Synthese aktiviert wird. Das aus der PT freigesetzte TSH aktiviert in der EC über TSHR/pCREB die *Dio2*-Expression und es kommt zu starken T3-Umsetzung und -Freisetzung. T3 führt zu einer vermehrten GnRH-Freisetzung und bewirkt somit eine Potenzierung des durch PRL angeregten Gonadenwachstums. Unter Kurztagbedingungen wird mehr Melatonin produziert und dadurch verstärkt TSHR synthetisiert, wodurch es zur verstärkten PER1-Synthese kommt. Diese führt zur verminderten TSH-Synthese und -Freisetzung, was mit der geringeren PRL-Freisetzung aus der PD eine Hemmung des Gonadenwachstums bewirkt.

5 Zusammenfassung

Das ausschließlich bei Nacht synthetisierte und freigesetzte Melatonin übt als das zentrale Hormon der Dunkelheit eine wichtige Funktion innerhalb des circadianen Systems der Säugetiere aus. Darüber hinaus stellt Melatonin das wichtigste Signal bei saisonalen Prozessen dar. Die Übermittlung photoperiodischer Beleuchtungsverhältnisse erfolgt hauptsächlich über den spezifischen Melatoninrezeptor1a (MT1) in der hypophysären *Pars tuberalis* (PT). Bislang ist der Einfluss des Melatonins auf die Genexpression in der PT nur unzureichend untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst eine vergleichende Mikroarray-Analyse der Genexpression in PT-Zellen von MT1-defizienten und dazugehörigen Wildtyp-Mäusen zu je einem Tag- und einem Nachtzeitpunkt durchgeführt. Insgesamt wurden zwölf potentiell Melatonin-abhängige Gene identifiziert, die mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung weiter charakterisiert wurden. Period1-Protein defiziente-Mäuse wurden in die weiteren Untersuchungen einbezogen, um zusätzlich den Einfluss des molekularen Uhrwerks auf die Genexpression in der PT zu untersuchen. Um den akuten Einfluss des Melatonins zu überprüfen, wurden Wildtyp-Mäuse am Tag mit Melatonin behandelt.

Es zeigte sich, dass Melatonin in der PT der Maus nicht nur die Expression des gut charakterisierten Uhrengens Cryptochrom1 (*Cry1*) sondern auch des Thyroidea-Hormonrezeptor (*Tshr*) -Gens akut aktiviert, während es die Expression des Timeout (*Tim*) -Gens und der beta-Untereinheit des Thyroidea-stimulierenden Hormons (*Tshb*) sowie des luteinisierenden Hormons (*Lhb*) akut inhibiert. Gleichzeitig wird die Expression von *Tshb* und *Lhb* durch den negativen Regulatorkomplex (bestehend aus Period- und Cryptochrom-Proteinen) und somit durch das molekulare Uhrwerk gehemmt. Die Ergebnisse deuten außerdem auf einen Langzeiteffekt des Melatonins auf die Expression des Albumin D-

Element bindendem Protein (*Dbp*), des Neurodifferentiation (*Neurod1*), des neuronalen PAS Protein4 (*Npas4*) und des Riken 7530404M11 -Gens hin. Ein Tag/Nacht Unterschied in der Genexpression der beta-Untereinheit des follikel-stimulierenden Hormons (*Fshb*) wurde beobachtet, dieser wird jedoch nicht durch Melatonin oder das molekulare Uhrwerk beeinflusst.

Untersuchungen der Genexpression in anderen Hirnarealen zeigten, dass Melatonin im *Nucleus arcuatus* die Expression des Proopiomelanocortin1 (*Pomc1*) -Gens akut aktiviert, aber anscheinend nur eine indirekte Wirkung auf die Expression des Östrogenrezeptors-alpha (*Esr1*) -Gens ausübt. Darüber hinaus zeigen die Daten einen Langzeiteffekt des Melatonins auf die *Dbp*-Expression in der Ependymschicht des III. Ventrikels sowie in den *Nuclei habenulares* und im *Gyrus dentatus* des Hippocampus. Über einen ähnlichen Langzeiteffekt könnte Melatonin auch die *Npas4*-Expression in der *Cornus ammonis*1 und 3 (CA1 und CA3) Region des Hippocampus beeinflussen. Im Gegensatz dazu ist der Tag/Nacht Unterschied der *Dbp*-Expression in den Kernregionen der CA1 und CA3 des Hippocampus unabhängig von Melatonin oder dem molekularen Uhrwerk.

Die Befunde belegen, dass die PT der Maus ein gut geeignetes Modellsystem zum Studium der Melatoninwirkung auf die Genexpression darstellt. Es zeigte sich, dass Melatonin nicht nur das molekulare Uhrwerk sondern auch direkt endokrine Prozesse in der PT beeinflusst. Die in der Arbeit dargestellte Steuerung der Genexpression durch Melatonin in der PT und in verschiedenen anderen Hirnarealen untermauert die Bedeutung dieses Hormons im circadianen System. Ferner zeigen die Daten, dass Melatonin einen differentiellen Einfluss auf die Genexpression hat und sorgen dadurch für ein besseres Verständnis der komplexen Wirkungsweise des Hormons im neuronalen und neuroendokrinen System.

6 Summary

Nocturnal secretion of the pineal hormone melatonin plays a major role in the circadian system of mammals. Moreover, seasonal cycles in melatonin modulate multiple physiological systems. The hypophyseal pars tuberalis (PT) expresses a high density of the melatonin_{1a} receptor (MT₁), which is believed to regulate seasonal physiology by decoding changes in nocturnal melatonin secretion. However, so far little is known about the control of gene expression by melatonin. Therefore a microarray analysis was performed. PT cells of MT₁-deficient mice and the corresponding wildtype at mid-subjective day and mid-subjective night revealed twelve potential melatonin-dependent genes. The results were confirmed by *in situ* hybridization. Additionally the effect of the molecular clockwork on the expression of melatonin-dependent genes in the PT was analyzed using mice with a targeted disruption of the *Period1* gene. Finally, acute effects of melatonin on gene expression were determined in wildtype mice.

In summary, this study showed that melatonin acting through the MT₁ receptor activates acutely the expression of the clockgene cryptochrome1 (*Cry1*) and the thyroid-stimulating hormone receptor (*Tshr*) while the expression of timeout (*Tim*) and of the luteinizing hormone beta (*Lhb*) as well as of thyroid-stimulating hormone beta (*Tshb*) was acute inhibited by melatonin. Coincidental the expression of *Tshb* and *Lhb* is inhibited by the negative regulator complex (consisting of PER and CRY proteins) and therefore by the molecular clockwork.

Furthermore, the results suggest a longterm effect of melatonin on the gene expression of the albumin D element binding protein (*Dbp*), neurodifferentiation1 (*Neurod1*), neuronal PAS protein4 (*Npas4*) and 7530404M11 Riken. A day/night difference in the expression of the follicle-stimulating hormone beta (*Fshb*) was observed which is not affected by melatonin or the molecular clockwork.

Analysis of gene expression in other parts of the mouse brain showed, that melatonin activates acutely the expression of proopiomelanocortin1 (*Pomc1*) while it seemed that melatonin has only an indirect effect on the expression of the estrogen receptor1 (*Esr1*) in the arcuate nucleus. A longterm effect of melatonin on the expression of *Dbp* was observed in the ependymal layer of the third ventricle as well as in the habenular nucleus and the gyrus dentatus of the hippocampus. A similar expression pattern was observed for *Npas4* in the hippocampal cornu ammonis (CA) 1 and 3 region. In contrast, *Dbp* expression in the hippocampal CA1 and CA1 region appear to be independent of melatonin and the molecular clockwork.

This study shows that the mouse PT is a powerful model to study the effects of melatonin on gene expression. Melatonin does not only affect the molecular clockwork but also directly endocrine pathways in this tissue. The results on the regulation of the gene expression in different brain regions show the importance of this hormone in the circadian system of mammals. In addition, this study revealed that melatonin influences gene expression directly and indirectly and thus gives a better understanding of the complex effects of the hormone in the neuronal and neuroendocrine system.

7 Glossar

Begriffe ohne sinnvolle Übersetzung werden kursiv dargestellt.

*) Gene, mRNA und deren Translationsprodukte, die im Rahmen dieser Arbeit wiederholt vorkommen; dabei werden Gene und mRNA kursiv, Proteine in Standardformatierung dargestellt.

AANAT ^{*)}	Arylalkylamin <i>N</i> -Acetyltransferase
A _{2b}	Adenosin _{2b}
AC	Adenylatzyklase
ACTH ^{*)}	adrenocorticotrophes Hormon
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
AS	<i>antisense</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BMAL ^{*)}	<i>brain and muscle Arnt-like</i>
¹⁴ C	Kohlenstoff-14-Isotop (Halbwertszeit = 5730 Jahre)
CA	<i>Cornus ammonis</i>
CaMK	Calmodulin-Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ccgs	<i>clock controlled genes</i>
Ci	Curie
CK	Kaseinkinase
CLOCK ^{*)}	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	<i>Ca²⁺/cAMP responsive element</i>
CREB ^{*)}	<i>Ca²⁺/cAMP responsive element-binding protein</i>
CRY ^{*)}	<i>Cryptochrome</i>
CT	<i>circadian time</i>
DBP ^{*)}	<i>albumin D-element binding protein</i>
DD	Dauer-Dunkel-Bedingungen

DIO2 ^{*)}	Triiodothyronin Deiodinase Typ2
DMH	<i>Nucleus dorsomedialis hyophthalmi</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DYS ^{*)}	<i>dysfusion</i>
EC	Ependymschicht des III. Ventrikels
EM	<i>Eminentia mediana</i>
ESR ^{*)}	Östrogenrezeptor
FSH ^{*)}	follikelstimulierendes Hormon
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
GCS	<i>Ganglion cervicale supericus</i>
GH ^{*)}	<i>growth hormon</i>
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
HP	Hybridisierungspuffer
ICER ^{*)}	<i>inducible cAMP early repressor</i>
Ir	Immunreaktion
JAK	Janus-Kinase
ko	<i>knock out</i>
KT	Kurztag
LD	Licht-Dunkel-Bedingung
LE-PAS ^{*)}	<i>limbic enriched PAS</i>
LH ^{*)}	lutenisierendes Hormon
LMD	<i>laser microdissection</i>
LT	Langtag
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBH	mediobasaler Hypothalamus
MEL	Melatonin

MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSH	Melanocyten-stimulierendes Hormon
MT1	Melatoninrezeptor1a
MT2	Melatoninrezeptor1b
MT1ko	Melatoninrezeptor1a-defizient
n	Anzahl der Stichproben
NA	Noradrenalin oder <i>Nucleus arcuatus</i>
NECA	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
NEUROD ^{*)}	<i>Neurodifferentiation</i>
NH	<i>Nuclei habenulares</i>
NPAS ^{*)}	<i>neuronal PAS domain protein</i>
NRC	negativer Regulatorkomplex
NXF ^{*)}	neuronaler Transkriptionsfaktor
O.D.	optische Dichte
p	Standardabweichung bzw. Wahrscheinlichkeit
³³ P	Phosphor-33-Isotop (Halbwertszeit = 25,34 Tage)
p.a.	<i>pro analysis</i>
PACAP ^{*)}	<i>pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i>
PAS	<i>Per, Arnt, Sim</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pCREB ^{*)}	phosphoryliertes CREB
PD	<i>Pars distalis</i>
PER ^{*)}	<i>Period</i>
PER1ko	Period1-Protein-defizient
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PIN	Pinealorgan
Pit	<i>pituitary-specific transcription factor</i>
POMC ^{*)}	<i>Proopiomelanocortin</i>
PNS	photoneuroendokrines System

PRL ^{*)}	<i>Prolactin</i>
PT	<i>Pars tuberalis</i>
RET	Retina
REV-ERB ^{*)}	<i>orphan nuclear receptor Rev-Erb</i>
RHT	retinohypothalamischer Trakt
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale-Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROR ^{*)}	<i>retinoic acid-related orphan receptor</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
S	<i>sense</i>
SAD	<i>seasonal affective disorder</i>
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SD	<i>short day</i>
SLR	<i>single log ratio</i>
T3	Triiodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
TAFA ^{*)}	Rikengen 7530404M11
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TIM ^{*)}	<i>timeless</i> bei Drosophila, <i>timeout</i> bei Säugern
TRH	Thyroidea-freisetzendes Hormon
TRHR	Thyroidea-freisetzender Hormon Rezeptor
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TSH ^{*)}	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TSHR ^{*)}	Thyroidea-stimulierender Hormonrezeptor
VMH	<i>Nucleus ventromedialis hyphothalami</i>
vs.	<i>versus</i>
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
ZT	<i>Zeitgeber time</i>

8 Literatur

Ahn JM, Jung HK, Cho C, Choi D, Mayo KE, Cho BN (2004) Changes in the reproductive functions of mice due to injection of Plasmid expressing an inhibin alpha-subunit into muscle: a transient transgenic model. *Molecular Cells* 18:79-86

Aizawa S, Hoshino S, Sakata I, Adachi A, Yashima S, Hattori A, Sakai T (2007) Diurnal change of thyroid-stimulating hormone mRNA expression in the rat pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 19:839-846

Akagi T, Inoue T, Miyoshi G, Bessho Y, Takahashi M, Lee JE, Guillemot E, Kageyama R (2004) Requirement of multiple basic helix-loop-helix genes for retinal neural subtype specification. *J Biol Chem* 279:28492-28498

Akashi M, Takumi T (2005) The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12:441

Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, Kyriacou CP (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biol* 12:540:550

Antoch AM, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MA, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangaoram AM, King DP, Pinto LH, Takahashi JS (1997) Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89:655-667

Arendt A, Symons AM, Laud Ca, Pryde SJ (1983) Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *J Endocrinol* 97:395-400

Arendt J (1995): Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall London:201-285

- Arendt J, Skene DJ, Middleton B, Lockley SW, Deacon S (1997) Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness. *J Biol Rhythms* 12:604-618
- Arendt J (2003) Importance and Relevance of melatonin to human biological rhythms *J Neuroendocrinol* 15:427-431
- Aschoff J (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25:11-28
- Aschoff J, Fatranska M, Giedke H, Doerr P, Stamm D, Wisser H (1971) Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. *Science* 171:213-215
- Aschoff J (1984) Circadian timing. *Ann N Y Acad Sci* 423:442-468
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1989) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525-536
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344-2347
- Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309:193-199
- Barnes JW, Tischkau SA, Barnes JA, Mitchell JW, Burgoon PW, Hickok JR, Gillette MU (2003) Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science* 302:439-442
- Barrett P, Ivanova E, Graham ES, Ross AW, Wilson D, Plé H, Mercer JG, Ebling FJ, Schuhler S, Dupré SM, Loudon A, Morgan PJ (2006) Photoperiodic regulation of cellular retinoic acid-binding protein 1, GPR50 and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol* 191:687-98.

- Barrett P, Ebling FJ, Schuhler S, Wilson D, Ross AW, Warner A, Jethwa P, Boelen A, Visser TJ, Ozanne DM, Archer ZA, Mercer JG, Morgan PJ (2007) Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148:3608-3617
- Baumgart P (1991) Circadian rhythm of blood pressure: internal and external time tiggers. *Chronobiol Int* 8:444-450
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 6:544-556
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H (1990) The protein ID: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61:49-59
- Benna C, Scannapieco P, Piccin A, Sandrelli F, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Valle G, Costa R (2000) A second timeless gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian tim. *Curr Biol* 10:R512-513
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530
- Bicknell AB (2008) The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrino* 20:262-699
- Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW (2004) Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 225:29-36
- Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ (1983) Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113:2276-2283
- Bockmann J, Böckers TM, Vennemann B, Niklowitz P, Müller J, Wittkowski W, Sabel B, Kreutz MR (1996) Short photoperiod-dependent down-

regulation of thyrotropin-a and -b in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* 137:1804-1813

Bockmann J, Böckers TM, Winter C, Wittkowski W, Winterhoff H, Deufel T, Kreutz MR (1997) Thyrotropin expression in hypophyseal pars tuberalis-specific cells is 3,5,3'-triiodothyronine, thyrotropin-releasing hormone, and pit-1 independent. *Endocrinology* 138:1019-28.

Böckers TM, Niklowitz P, Bockmann J, Fauteck JD, Wittkowski W, Kreutz MR (1995) Daily melatonin injections induce cytological changes in pars tuberalis-specific cells similar to short photoperiod. *J Neuroendocrinol* 7:607-613

Böckers TM, Bockmann J, Fauteck JD, Wittkowski W, Sabel BA, Kreutz MR (1996) Evidence for gene transcription of adeno-hypophyseal hormones in the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 63:16-27

Böckers TM, Bockmann J, Salem A, Niklowitz P, Lerchl A, Huppertz M, Wittkowski W, Kreutz MR (1997) Initial expression of the common alpha-chain in hypophyseal pars tuberalis-specific cells in spontaneous recrudescence hamsters. *Endocrinology* 138:4101-4108

Borjigin J, Wang MM, Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Nature* 378:783-785

Brendow K, Korf HW (1998) Morphological and immunocytochemical features of the pineal organ of C3H and C57BL mice at different stages of postnatal development. *Cell Tissue Res* 292:521-530

Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R (1999) Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*. 13:2025-2038

Cai W, Rambaud J, Teboul M, Masse I, Benoit G, Gustafsson JA, Delaunay F, Laudet V, Pongratz I (2008) Expression levels of estrogen

receptor β are modulated by components of the molecular clock. *Mol Cell Biol* 28:784-793

Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM (1989) Melatonin signal transduction in hamster brain; inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* 125:2670-2676

Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale W, Chin WW (1989) Inhibin, activin, and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Mol Endocrinol* 3:1969-76.

Cau E, Wilson SW (2003) Ash 1a and Neurogenin1 function downstream of floating head to regulate epiphyseal neurogenesis. *Development* 130:2455-2466

Chantoux E, Francon J (2002) Thyroid hormone regulates the expression of NeuroD/BHF1 during the development of rat cerebellum. *Mol Cell Endocrinol* 194:157-163

Cho JH, Tsai MJ (2004) The role of BETA2/NeuroD1 in the development of the nervous system. *Mol Neurobiol* 30:35-47

Chu S, Fuller PJ (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor β gene. *Mol Cell Endocrinol* 132:195-199

Clark JT, Karla PS, Crowley WR, Karla SP (1984) Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427-429

Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MAA, Koonin EV, Klein DC (1995) Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681-1683

Danforth DN Jr, Tamarkin L, Mulvihill JJ, Bagley CS, Lippman ME (1985) Plasma melatonin and the hormone-dependency of human breast cancer. *J Clin Oncol* 3:941-948

Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosin P, Pévet P, Masson-Pévet M (2003) Melatonin induces Cry1

expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 114:101-106

Dardente H, Klosen P, Pévet P, Masson-Pévet M (2003) MT1 Melatonin receptor mRNA expressing cells in the Pars tuberalis of the European hamster: effects of photoperiod. *J Neuroendocrinol* 15:778-786

Dardente H (2007) Does a melatonin-dependent circadian oscillator in the pars tuberalis drive prolactin seasonal rhythmicity? *J Neuroendocrinol* 19:657-666

DeBryne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007) Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr Biol* 17:R538-539

Dellman HD, Stoeckel ME, Hindelang-Gertner C, Porte A, Stutinsky F (1974) A comparative ultrastructural study of the pars tuberalis of various mammals, the chicken and the newt. *Cell Tissue Res* 148:313-329

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L (1987) Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: results of a double-blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry* 20:242-244

Drew JE, Barrett P, Mercer JG, Moar KM, Canet E, Delagrang P, Morgan PJ (2001) Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 13: 453-458

Dubocovich ML, Markowska M (2005) Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27:101-110

Duez JE, Staels B (2008) The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diab Vasc Dis Res* 5:82-88

Duffield GE, Best JD, Meurers BH, Bittner A, Loros JJ, Dunlap JC (2002) Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol* 12:551-557

Duffield GE (2003) DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol* 15:991-1002

Dupré SM, Loudon ASI (2007) Circannual clocks: annual timers unraveled in sheep. *Current Biol* 17:R216-217

Dunlap JC (2004) Kinases and circadian clocks: per goes it alone. *Dev Cell* 6:160-161

Dunlap JC; Loros JJ (2004) The neurospora circadian system. *J Biol Rhythms* 19:414-424

Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M (1986) Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231:491-493

Ebihara S, Hudson DJ, Marks T, Meanker M (1987) Pineal indole metabolism in the mouse. *Brain Res* 416:136-140

Fallest PC, Trader GL, Darrow JM, Shupnik MA (1995) Regulation of rat luteinizing hormone β gene expression in transgenic mice by steroids and a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Biology Reprod* 53:103-109

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RG (1997) Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165-168

Fernández M, Sánchez-Franco F, Palacios N, Sánchez I, Cacicedo L (2005) IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *J Mol Endocrinol* 34:699-712

Ferris HA, Shupnik MA (2006) mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod* 74:993-998.

Flood WD, Moyer RW, Tsykiin A, Sutherland GR, Koblar SA (2004) Nxf and Fbxo33: novel seizure-responsive genes in mice. *Eur J Neurosci* 20:1819-26

Fonjallaz P, Ossipow V, Wanner G, Schibler U (1996) The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-

specific expression, but have different target promoter preferences. *EMBO J* 15: 351-361

Franken P, Lopez-Molina L, Marcacci L, Schibler U, Trafti M (2000) The transcription factor DBP affects circadian sleep consolidation and rhythmic EEG activity. *J Neurosci* 20:617-625

Franken P, Thomason R, Heller HC, O'Hara BF (2007) A non-circadian role for clock-genes in sheep homeostasis: a strain comparison. *BMC Neurosci* 8:87

Freeman DA, Teubner BJW, Smith CD, Prendergast BJ (2007) Exogenous T3 mimics long day in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R2368-R2372

Gaudilliere B, Konishi Y, de la Iglesia N, Yao G, Bonni A (2004) A Ca^{2+} /M K^{2+} -NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41:229-241

Gekakis TA, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564-1569

Ghil S, Jeon YJ, Suh-Kim H (2002) Inhibition of BETA2/NeuroD by ID2. *Exp Mol Med* 34:367-373

Gillette MU (1986) The suprachiasmatic nuclei: circadian phase-shifts induced at the time of hypothalamic slice preparation are preserved in vitro. *Brain Res* 379:176-181

Godson C, Reppert SM (1997) The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138:397-404

Goldman BD (2001) mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16:283-301

Gorfine T, Assaf Y, Goshen-Gottstein Y, Yeshurun Y, Zisapel N (2006) Sleep-anticipating effects of melatonin in the human brain. *Neuroimage* 31:410-418

- Gorfine T, Yeshurun Y, Zisapel N (2007) Nap and melatonin-induced changes in hippocampal activation and their role in verbal memory consolidation. *J Pineal Res* 43:336-342
- Goto M, Oshima I, Tomita T, Ebihara S (1989) Melatonin content of the pineal glands in different mouse strains. *J Pin Res* 7:195-204
- Gotter AL, Manganaro T, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Possidente B, Sriram S, MacLaufhlin DT, Reppert SM (2000) A time-less function for mouse timeless. *Nat Neurosci* 3:755-756
- Gotter AL (2006) A Timeless debate: resolving TIM's noncircadian roles with possible clock function. *Neuroreport* 17:1229-1233
- Graham ES, Webster CA, Hazlerigg DG, Morgan PJ (2002) Evidence for the biosynthesis of a prolactin-releasing factor from the ovine pars tuberalis, which is distinct from thyrotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 14:945-954
- Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ, Blaustein JD (2001) Coexpression of ER β with ER α and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142:5172-5181
- Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245:198-200
- Gregory SJ, Townsend J, McNeilly AS, Tortones DJ (2004) Effects of prolactin on the luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone in primary pituitary cell cultures during the ovine annual reproductive cycle. *Biol Reprod* 70:1299-305
- Gross DS (1984) The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 56:283-298
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:519-561

- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N (2005) Differential controls of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20:391-403
- Hanon EA, Lincoln GA, Fustin JM, Dardente H, Masson-Pévet M, Morgan PJ, Hazlerigg DG (2008) Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol* 18:1147-52
- Hastings MH, Follett BK (2001) Toward a molecular biological calendar? *J Biol Rhythms* 16:424-430
- Hazlerigg DG, Morgan PJ, Lawson W, Hastings MH (1991) Melatonin inhibits the activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured pars tuberalis cells from ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 3:597-603
- Hoffman RA, Reiter RJ (1965) Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. *Science* 148:1609-1611
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958
- Huang HJ, Sebastian J, Strahl BD, Wu JC, Miller WL (2001) The promoter for the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene (FSHbeta) confers FSHbeta-like expression on luciferase in transgenic mice: regulatory studies in vivo and in vitro. *Endocrinology* 142:2260-2266
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RG, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Target disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141
- Ishizuka N, Minami K, Okumachi A, Okuno M, Seino S (2007) Induction by Neurod of the components required for regulated exocytosis. *Biochem Biophys Res Com* 354:271-277
- Jackson SM, Gutierrez-Hartmann A, Hoeffler JP (1995) Upstream stimulatory factor, a basic helix-loop-helix-zipper protein, regulates the

activity of the alpha-glycoprotein hormone subunit gene in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 9:278:291

Jiang L, Crews ST (2003) The *Drosophila* dysfusion basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS gene controls tracheal fusion and levels of the trachealess bHLH-PAS protein. *Mol Cell Biol* 23: 5625-5637

Jiang L, Crews ST (2007) Transcriptional specificity of *Drosophila* dysfusion and the control of tracheal fusion cell gene expression. *J Biol Chem* 282:28659-28668

Jilg A, Moek J, Weaver DR, Korf HW, Stehle JH, von Gall C (2005) Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signaling. *Eur J Neurosci* 22:2845-2854

Johnston JD, Ebling FJ, Hazlerigg DG (2005) Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* 21:2967-74

Johnson RF, Morin LP, Moor RY (1988) Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462:301-312

Kameda Y (1990) Occurrence of colloid-containing follicles and ciliated cysts in the hypophysial pars tuberalis from guinea pigs of various ages. *Am J Anat* 188:185-198

Kameda Y, Miura M, Ohno S (1998) Localization and development of chromogranin A and luteinizing hormone immunoreactivities in the secretory-specific cells of the hypophyseal pars tuberalis of the chicken. *Histochem Cell Biol* 109: 211-222

Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE (1984) Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research* 40:185-233

Kawakami C, Ohshige K, Tochikubo O (2008) Circadian variation in cardiovascular emergencies among the elderly. *Clin Exp Hypertens* 30:23-31

- Kawauchi H, Takahashi A, Abe K (1981) gamma-melanotropin is not present in an N-terminal peptide of salomon proopiocortin. *Int J Pept protein Res* 18:223-227
- Kell CA, Stehle JH (2005) Just the two of us: Melatonin and Adenosine in rodent pituitary function. *Ann Med* 37:105-20
- King DP, Vitaterna MH, Chang AM, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1997) The mouse Clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of Kit. *Genetics* 1997 146:1049-1060
- Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*. D Evered, S Clark (Eds). London: Pitman, pp 38-56
- Klein DC (1991)
- Klein DC (2007) Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem* 282:4233-4237
- Klosen P, Bienvenu C, Demarteau O, Dardente H, Guerrero H, Pévet P, Masson-Pévet M (2002) The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem* 50:1647-1657
- Klugmann M, Leichtlein CB, Symes CW, Klaussner BC, Brooks AI, Young D, During MJ (2006) A novel role of circadian transcription factor DBP in hippocampal plasticity. *Mol Cell Neurosci* 31:303-314
- Kopp C, Vogel E, Rettori MC, Delagrangé P, Renard P, Lesieur D, Misslin R (1999) Regulation of emotional behavior by day length in mice: implication of melatonin. *Behav Pharmacol* 10:747-752
- Kopp P, Jameson JL, Roe TF (1997) Congenital nonautoimmune hyperthyroidism in a nonidentical twin caused by a sporadic germline mutation in the thyrotropin receptor gene. *Thyroid* 7:765-70
- Korf HW (1994) The pineal organ as a component of the biological clock. *Ann NY Acad Sci* 719:13-42

- Korf HW (1996) Innervation of the pineal gland. In: The Autonomic Nervous System. Autonomic-Endocrine Interactions. K. Unsicker (Ed.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 10:129-180
- Korf HW, Schomerus C, Stehle JH (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. Adv Anat Embryol Cell Biol 146: 1-100
- Korf HW, Stehle JH (2002) The circadian system: circuits-cells-clocks-genes. Cell Tissue Res 309:1-2
- Kraus J, Höllt V (1995) Identification of a cAMP-response element on the human proopiomelanocortin gene upstream promoter. DNA Cell Biol 14:103-10
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA 93:5925-5930
- Kume K, Zylka MJ, Sieram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. Cell 98:193-205
- Kurita J, Shirasawa N, Mabuchi Y, Sakuma E, Sato Y, Sato G, Herbert DC, Soji T (2004) Intercellular communications within the rat anterior pituitary: immunohistochemical study on the relationship between the hypothalamus, agranular cells and GnRH neurons in the pars tuberalis and anterior pituitary gland. Acta Histochem Cytochem 37:227-239
- Lalli E, Sassone-Corsi P (1995) Thyroid-stimulating hormone (TSH)-directed induction of the CREM gene in the thyroid gland participates in the long-term desensitization of the TSH receptor. Proc Natl Acad Sci USA 92:9633-9637
- Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, Schibler U, Bonfils C (1996) Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in

mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol* 19:6788-6799

Lee C, Bea K, Ederly I (1998) The Drosophila CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation and interaction with the PER-TIM complex. *Neuron* 21:857-867

Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:844-867

Lehman M, Ebling FJP, Moenter FJK, Karsch FJ (1993) Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinology* 133:876-886

Lehman M, Karsch FJ (1993) Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase- and β -endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133:887-895

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y (1960) Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal. *J Biol Chem* 235:1992-1997

Lin S, Storlien LH, Huang YF (2000) Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* 875:89-95

Lincoln GA, Clarke IJ (1994) Photoperiodically-induced cycles in secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected ram: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 6:251-260

Lincoln GA (1994) Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. *J Endocrinol* 142:267-276

Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg D (2003) Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a

photoperiodic/circannual timer in the pars tuberalis. J Neuroendocrinol 15:390-397

Lincoln GA, Johnston JD, Andersson H, Wagner G, Hazlerigg DG (2005) Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. Endocrinology 146:3782-3790

Liu C, Weaver DR, Stogatz S, Reppert SM (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. Cell 91:855-860

Liu C, Weaver DR, Jin X, Sherman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. Neuron 19:91-102

Liu C, Reppert SM (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. Neuron 25:123-128

Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U (1997) The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. EMBO J 16: 6762-6771

Lowry PJ, Hope J, Silman RE (1976) The evolution of corticotrophin, melanotropin and lipotropin. In: James VHT (ed). 5th International Congress on Endocrinology. Amsterdam 402:71-76

Mabuchi Y, Shirasawa N, Sakuma E, Hashimoto Y, Kuno M, Coombs RJ, Herbert DV, Soji T (2004) Intercellular communication within the rat anterior pituitary: relationship between LH-RH neurons and folliculo-stellate cells in the pars tuberalis. Cell Tissue Res 317:79-90

Mains RE, Eipper BA, Ling N (1977) Common precursor to corticotropins and endorphins. Proc Natl Acad Sci USA 74:3014-3018

Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Locatelli A, Thiery JC (1994) Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. J Reprod Fertil 101:625-632

Malpaux B, Skinner DC, Maurice F (1995) the ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for the prolactin release. J Neuroendocrinol 7:199-206

Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P (2001) Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. J Biol Rhythms 16:336-347

Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH (1999) Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. J Neurosci 19:3326-3336

Matthews J, Gustafsson JA (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. Mol Interv 3:281-292

Maywood ES, Hastings MH (1995) Lesions of the idiomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. Endocrinology 136:144-1453

McArthur AJ, Gillette MU, Prosser ÅRA (1991) Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. Brain Res 565:158-161

McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ, (1994) Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. J Neuroendocrinol 6:523-532

Meister B (2007) Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. Physiol Behav 92:263-271

Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. Proc Natl Acad Sci USA 96:9938-9943

Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG, Morgan PJ (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the pars

tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12:2864-2870

Messenger S, Garabette ML, Hastings MH, Hazlerigg DG (2001) Tissue-specific abolition of Per1 expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12:579-582

Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* 12:3264-3275

Miller BH, Olson SL, Levine JE, Turek FW, Horton TH, Takahashi JS (2006) Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and clock mutant mice. *Biology of Reprod.* 75:778-784

Millington GWM (2007) The role of proopiomelanocortin (POMC) neurons in feeding behavior. *Nutrition and Metabolism* 4:18

Misztal T, Romanowicz, Barcikowski B (2002) Melatonin – a modulator of the GnRH/LH axis in sheep. *Reproductive Biology* 2:267-275

Misztal T, Wańkowska M, Górski K, Romanowicz K (2007) Central estrogen-like effect of genistein on growth hormone secretion in the ewe. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67:411-419

Miyazaki K, Mesaki M, Ishida N (2001) Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol* 21:6651-6659

Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146:1-14

Morgan PJ; Barrett H, Howell E, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24:101-146

Morgan PJ; Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, Maclean A, Barrett P (1996) The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates the gene expression in both lactotrophic and nonlactotrophic pituitary cells. *Endocrinology* 137:4018-4026

- Morgan PJ; Ross AW, Graham ES, Adam C, Messenger S, Barrett P (1998) oPer1 is an early response gene under photoperiodic regulation in the ovine pars tuberalis. J Neuroendocrinol 10:319-323
- Morgan PJ (2000) The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? J Neuroendocrinol 12:287-295
- Morrow EM, Furukawa T, Lee JE, Cepko CL (1999) NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. Development 126:23-36
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. Nature 443:289-295
- Moser M, Knoth R, Bode C, Patterson C (2004) LE-PAS, a novel Arnt-dependent HLH-PAS protein, is expressed in limbic tissues and transactivates the CNS midline enhancer element. Brain Res Mol Brain Res 128:141-149
- Mueller CR, Maire P, Schibler U (1990) DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. Cell 61:278-291
- Mühlbauer E, Peschke E (2007) Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. J Pineal Res 42:105-106
- Muñoz EM, Bailey MJ, Rath MF, Shi Q, Morin F, Coon SL, Møller M, Klein DC (2007) NeuroD1: development expression and regulated genes in the rodent pineal gland. J Neurochem 102:887-899
- Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB (1997) The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 94:3560-3564

- Mutoh T, Shibata S, Korf HW, Okamura H (2003) Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Physiol* 547:317-332
- Naik DV (1975) Immunoreactive LH-RH neurons in the hypothalamus identified by light and fluorescent microscopy. *Cell Tissue Res* 157:423-436
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN, Numa S (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature* 278:423-427
- Nakao N, Ono H, Yoshimura T (2008) Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction* 136:1-8
- Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Ligo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y, Sugano S, Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yaohimura T (2008) Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452:317-322
- Nakazawa K, Marubayashi U, McCann SM (1991) Mediation of the short-loop negative feedback of luteinizing hormone (LH) on LH-releasing hormone release by melatonin-induced inhibition of LH release from the pars tuberalis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7576-7579
- Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ (1995) Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9:1009-1019
- Neptune ER, Podowski M, Calvi C, Cho JH, Garcia JG, Tudor R (2008) Targeted disruption of NeuroD, a proneural basic helix-loop-helix factor, impairs distal lung formation and neuroendocrine morphology in the neonatal lung. *J Biol Chem* 283:21160-21169
- Nequin LG, Alvarez J, Schwartz NB (1979) Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biology Reproduction* 20:659-670

Nuesslein-Hildesheim B, O'Brien JA, Ebling FJ, Maywood ES, Hastings MH (2000) The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci* 12:2856-2864

Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K (2002) Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 309:47-56

Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H (2004) Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol Cell Biol* 24:608-616

Ooe N, Saito K, Oeda K, Nakatuka I, Kaneko H (2007) Characterization of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* NXF-like-factors, putative homologs of mammalian NXF. *Gene* 400:122-130

Pak TR, Chung WCJ, Hinds LR, Handa RJ (1997) Estrogen receptor- β mediates dihydrotestosterone-induced stimulation in neuronal cells. *Endocrinol* 148:3371-3382

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307-320

Pelletier J, Counis R, Reviers MM de, Tillet Y (1992) Localization of luteinizing hormone β -mRNA by in situ hybridization in the sheep pars tuberalis. *Cell Tissue Res* 267:301-306

Pennesi ME, Cho JH, Yang Z, Wu SH, Zhang J, Wu SM, Tsai MJ (2003) BETA2/NeuroD1 null mice: a new model for transcription factor-dependant photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 23:453-461

Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D (2000) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28:156-164

- Petersen DN, Thalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA (1998) Identification of estrogen receptor β 2, a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139:1082-1092
- Pierce JG, Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev biochem* 50:465-495
- PolICASTRO PF, Daniels-McQueen S, Carle G, Boime I (1986) A map of the hCG-LH gene cluster. *J Biol Chem* 261:5907-5916
- Poola I, Koduri S, Chatr S, Clarke R (2000) Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72:249-258
- Poulin G, Turgeon B, Drouin J (1997) NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-260
- Price RH Jr, Lorenzon N, Handa RJ (2000) Differential expression of estrogen receptor β splice variants in rat brain: identification and characterization of a novel variant missing exon 4. *Brain Res Mol Brain Res* 80:260-268
- Redman JR, Armstrong SM, Ng KT (1983) Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219:1089-1091
- Redman JR (1997) Circadian entrainment and phase shifting in mammals with melatonin. *J Biol Rhythms* 12:581-587
- Reiter RJ, Richardson BA, Johnson Ly, Ferguson Bn, Dinh DT (1980) Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980 210:1372-1373

- Reiter RJ (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrin Rev* 12:151-180
- Reppert SM (1995) Interaction between the circadian clocks of mother and fetus. *Ciba Found Symp* 183:198-207
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17:100-102
- Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647-676
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941
- Richter HG, Torres-Farfan C, Garcia-Sesnich J, Abarzua-Catalan L, Henriquez MG, Alvarez-Felmer M, Gaete F, Rehren GE, Seron-Ferre M (2008) Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 149:995-1003
- Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* 14:679-689
- Ripperger JA, Schibler U (2006) Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat Genet* 38:369-374
- Ripperger JA (2007) The rhythms of life. *Genome Biol* 8:3
- Roberts JL, Herbert E (1977) Characterization of a common precursor to corticotropin and β -lipotropin: cell-free synthesis of the precursor and identification of corticotrophin peptides in the molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4826-4830
- Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM (1996) Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel_{1a} melatonin receptor. *Endocrinology* 137:3469-3477

- Romanowitz K, Misztal T, Gajewska A, Barcikowski B (2001) Daily GnRH and LH secretion in ewes is not modified by exogenous melatonin during seasonal anestrus. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 61:289-297
- Rosbash N, Hall JC (1989) The molecular biology of circadian rhythms. *Neuron* 3:387-398
- Roseboom PH, Namboodiri MAA, Zimonjic DB, Popescu NC, Rodriguez IR, Gastel JA, Klein DC (1998) Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Mol Brain Res* 63:189-197
- Ross AW, Morgan PJ (2002) The pars tuberalis as a target of the central clock. *Cell Tissue Res* 309:163-171
- Ross BM, Knowler JT, McCulloch J (1992) On the stability of messenger RNA and ribosomal RNA in the brains of control human subjects and patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 58:1810-1819
- Rousseau K, Atcha Z, Loudon ASI (2003) Leptin and seasonal mammals. *J Neuroendocrinol* 15:409-414
- Roy EJ, Wilson MA (1981) Diurnal rhythm of cytoplasmic estrogen receptors in the rat brain in the absence of circulation estrogen. *Science* 213:1525-1527
- Sakai T, Sakamoto S, Ijima K, Matsubara K, Kato Y, Inoue K (1999) Characterization of TSH-positive cells in foetal rat pars tuberalis that fail to express Pit-1 factor and thyroid hormone β 2 receptors. *J Neuroendocrinol* 11:187-193
- Sakamoto S, Nakamura K, Inoue K (2000) Melatonin stimulates thyroid-stimulating hormone accumulation in the thyrotrophs of the rat pars tuberalis. *Histochem Cell Biol* 114:213-218
- Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, Fruechte EM, Vitaterna MH, Shimomura K, King DP, Young MW, Weitz CJ, Takahashi JS (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a

timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription Neuron 21:1101-1113.

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Brydon L, Jockers R, Ravid R, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F (2002) Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. J Pineal Res 32:59-62

Scharrer E (1964) Photo-Neuro-Endocrine Systems: General concepts. Ann N Y Acad Sci 117:13-22

Schibler U, Ripperger J, Brown SA (2003) Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. J Biol Rhythms 18:250-260

Shamloo M, Soriano L, von Schack D, Richhag M, Chin DJ, Gonzalez-Zulueta M, Gido G, Urfer R, Wieloch T, Nikolic K (2006) Npas4, a novel helix-loop-helix PAS domain protein, is required in response to cerebral ischemia. Eur J Neurosci 24:2705-2720

Sherman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Reppert SM (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. Neuron 19:1261-1269

Shirasawa N, Sakuma E, Wada I, Naito A, Horiuchi O, Mabuchi Y, Kanai M, Herbert DC, Soji T (2007) Intercellular communication within the rat anterior pituitary: XIV Electron microscopic and immunohistochemical study on the relationship between the agranular cells and GnRH neurons in the dorsal pars tuberalis of the pituitary gland. Anat Record 290:1388-1398

Skinner DC, Herbison AE (1997) Effect of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y and β -endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. Endocrinol 138:2585-2595

Skinner DC, Robinson JE (1997) Luteinising hormone secretion from the perfused ovine pars tuberalis and pars distalis: effects of gonadotropin-releasing hormone and melatonin. Neuroendocrinology 66:263-270

Skipper JK, Young LJ, Bergeron JM, Tetzlaff MT, Osborn CT, Crews D (1993) Identification of an isoform of the estrogen receptor messenger RNA lacking exon four and present in the brain. Proc Natl Acad Sci USA 90:7172-7175

Spessart R (2007) Photoperiodismus beim Säuger: Die Rolle von Melatonin. Abhandlung der Sächsischen Akademie der Wissenschaft zu Leipzig: Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Band 63 Heft 2. Endokrinologie II:57-74

Spiegelmann R, Lidar Z, Gofman J, Alezra D, Hadani M, Pfeffer R (2001) Linear accelerator radiosurgery for vestibular schwannoma. J Neurosurg 94:141-142

Starkey SJ, Walker MP, Beresford JM, Hagan RM (1995) Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin in vitro. Neuro Report 6:1947-1951

Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. Mol Endocrinol 6:384-393

Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. Nature 365:314-320

Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc Natl Acad Sci USA 69:1583-1586

Stephaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd RV, Buchfelder M, Fahlbusch R, Smyth H FK (1994) In situ Hybridization study of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human adenohypophysial cells and pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metabol 78: 83-88

Stirland JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS (2001) Photoperiodic regulation of prolactin

gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J Neuroendocrinol* 13:147-157

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490-493

Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90:100-1011

Takumi T, Nagamine Y, Miyake S, Matsubara C, Taguchi K, Takekida S, Sakakida Y, Nishikawa K, Kishimoto T, Niwa S, Okamura K, Okamura H (1999) A mammalian ortholog of *Drosophila* timeless, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPER1. *Genes Cells* 4:67-75

Tamarkin L, Danforth D, Lichter A, DeMoss E, Cohen M, Chabner B, Lippman M (1982) Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* 216:1003-1005

Taylor SC, Batten TF, Peers C (1999) Hypoxic enhancement of quantal catecholamine secretion. Evidence for the involvement of amyloid beta-peptides. *J Biol Chem* 274:31217-31222

Tang TY, Emtage P, Funk WD T, Arterburn M, Park EE, Rupp F (2004) TAFAs: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain *Genomics* 83:727-734

Tejada F, Cremades A, Aviles M, Castells MT, Penafiel R (1998) Hypokalemia alters sex hormone and gonadotropin levels: evidence that FSH may be required for luteinization. *American J Physiol* 275:1037-1045

Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H, Shibata S (2003) Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6795-6800

Tischkau SA, Barnes JA, Lin FJ, Meyers Em, Barnes JW, Meyer-Bernstein EL, Hurst WJ, Burgoon PW, Chen D, Sehgal A, Gillette MU (1999) Oscillation and light induction of timeless mRNA in the mammalian circadian clock *J Neurosci* 19:RC15

- Tischkau SA, Cohen JA, Stark JT, Gross DR, Bottum KM (2007) Time-of-day affects expression of hippocampal markers for ischemic damage induced by global ischemia. *Exp Neurol* 208: 314:322
- Toh KL, Jones CR, HE Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291:1040
- Tousson E, Meissl H (2004) Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 24:2983-2988
- Trepel M (2004) *neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Elsevier GmbH, Münschen. 3:203-206
- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythm. *Nature* 398:627-630
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435:359-362
- Vitale PM, Darrow JM, Duncan MJ, Shustak CA, Goldman BD (1985) Effects of photoperiod, pinealectomy and castration on body weight and daily torpor in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 106:367-375
- Vollrath L, Semm P, Gammel G (1980) Sleep induction by intranasal application of melatonin. In *melatonin-current studies and perspectives*. *Advances in Bioscience*. 29:327-331
- von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, Kopp MD, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH (1998) CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP and melatonin for clockwork access. *J Neurosci* 18:10389-10397

- von Gall C, Weaver DR, Koch M, Korf HW, Stehle JH (2000) Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. *Neuroreport* 11:1803-1807
- von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5:234-238
- von Gall C, Stehle JH, Weaver DR (2002) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309:151-162
- von Gall C (2003) Rhythmic clock gene expression in the hypophyseal pars tuberalis is regulated by melatonin. *Ann Anat* 185:301-302
- von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW (2005) Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis *Ann N Y Acad Sci* 1040:508-511
- Wagner GC, Johnston JD, Tournier BB, Ebling FJP, Haszlerigg DG (2007) Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Europ J Neurosci* 25:485-490
- Watanabe S, Watanabe H, Nagai K, Ooki H, Honda N, Tanaka R (1981) Anesthetic management of pacemaker implantation: clinical analysis of cervical epidural anesthesia. *Masui* 30:1368-1373
- Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG, Reppert SM (1991) Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 76:295-301
- Weaver DR, Provencio I, Calson LL, Reppert SM (1991) Melatonin receptors and signal transduction in photorefractory Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 128:1086-1092

Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG, Reppert SM (1993) Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 76:295-301

Weaver DR (1999) melatonin and circadian rhythmicity in vertebrates. Physiological roles and pharmacological effects. In: Regulation of sleep and circadian rhythms. FW Turek, PC Zee (Eds). New York: Marcel Dekker, pp 196-262

Wehr TA, Duncan WC Jr, Sher L, Aeschbach D, Schwartz PJ, Turner EH, Postolache TT, Rosenthal NE (2001) A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58: 1108-1114

Weiss J, Guendner MJ, Halvorson LM, Jameson JL (1995) Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology* 136:1885-1891

Wittkowski W, Bergmann M, Hoffmann K, Pera F (1988) Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Photopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 251:183-187

Wittkowski W (1998) Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microsc Res Tech* 41:29-42

Wittkowski W, Bockmann J, Kreutz MR, Böckers TM (1999) Cell and molecular biology of the pars tuberalis. *Int Rev Cytol* 185:157-194

Wood WM, Dowding JM, Gordon DF, Ridgway EC (1999) An upstream regulator of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene mediates pituitary cell type activation and repression by different mechanisms. *J Biol Chem* 274:11526-15532

Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J (1996) Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous

cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 137:5463-5467

Wurian J, Falvey E, Lavery D, Talbot D, Schmidt E, Ossipow V, Fonjallaz P, Schibler U (1992) The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression. *J Cell Sci Suppl* 16:123-127

Yagita K, Yamaguchi S, Tamanini F, van der Horst GT, Hoeijmakers JH, Yasui A, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H (2000) Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev* 14:1353

Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20:4773-4781

Yan L, Miyake S, Okamura H (2000) Distribution and circadian expression of dbp in SCN and extra-SCN areas in the mouse brain *J Neurosci Res* 59:291-295

Yamamura T, Yasuo S, Hirunagi K, Ebihara S, Yoshimura T (2006) T(3) implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res* 324:175-179

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682-685

Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW (2007) Temporal dynamics of type 2 deiodinase expression after melatonin injections in Syrian hamsters. *Endocrinology* 148:4385-4392

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5339-5346

- Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S (2003) Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426:178-181
- Yu CX, Wu GC, Xu SF, Chen CH (2000) Melatonin attenuates the intensity of beta-endorphin immunoreactivity in the arcuate nucleus of rat hypothalamus. *Sheng Li Xue Bao* 52:263-266
- Zamorskii II, Pishak VP (2000) Effect of melatonin on cyclic nucleotide content and intensity of lipid peroxidation in the hippocampus and habenula of rats exposed to acute hypoxia. *Bull Exp Biol Med* 130:756-758
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Brandley A (1999) The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400:169-173
- Zylka MJ, Sherman LP, Levine JD, Jin X, Weaver DR, Reppert SM (1998) Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* 21:1115-1122
- Zylka MJ, Sherman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20:1103-1110

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin PD Dr. Charlotte von Gall für ihre freundschaftliche Unterstützung, ihr Vertrauen und den Freiraum bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Horst-Werner Korf, nicht nur für die Ermöglichung der Arbeit in der Anatomie II, sondern vor allem für sein stetiges Interesse sowie seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Felicitas Pfeifer von der TU Darmstadt für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit. Nicht nur ihre Seminare, sondern auch die netten Gespräche ließen mich immer wieder über den Tellerrand meiner eigenen Arbeit hinausblicken.

Ein Dickes Dankeschön gilt Giesela Müller und Dorothea von Meltzer für das stets offene Ohr und die Bewältigung der Probleme im Büroalltag.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Shinobu Yasuo für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen Anregungen und Diskussionen.

Besonders möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen und Mitgliedern der Anatomie II bedanken, für die tolle Atmosphäre im Labor und dafür, dass sie mich mit Rat und Tat unterstütz und begleitet haben. Dies waren im besonderen: Elke Laedtke, Iris Habazettl, Chalid Ghadban, Doris Evers, Kaia Lang, Dr. Martina Pfeffer, Dr. Christof Schomerus, Dr. Marco Koch, Dr. Faramarz Dehghani, Dr. Qiang Zhang, Dr. Helmut Wicht, Dr. Virginie Dinet, Elmar Christ, Nariman Ansari, Ana Shalabi, Antje Jilg, Katrin Ackermann.

Bei meiner ganzen Familie und meinen Freunden möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken, die mir immer eine große Hilfe war.

Meinem Freund Thomas und meinen Eltern gilt der größte Dank dafür, dass sie mir stets zur Seite standen und fest an mich geglaubt haben.

Zuletzt danke ich der Firma Haribo, die mir die Zeit so schön versüßt hat.

Lebenslauf

Claudia Unfried, geboren am 23.März 1973 in Langen/Hessen

STUDIUM UND PROMOTION

10/1995 – 10/2002	Biologiestudium an der Technischen Universität Darmstadt mit dem Hauptfach Pflanzenphysiologie und den Nebenfächern Biochemie und Botanik
01/2002 – 10/2002	Durchführung der Diplomarbeit erfolgte für die Dauer von 3 Monaten in Indien und wurde vom DAAD gefördert
10/2002	Abschluss: Diplom-Biologin
12/2002 – 12/2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Mikrobiologie an der Technischen Universität Darmstadt
05/2004 – 07/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Experimentellen Neurobiologie am Institut für Anatomie II der Dr. Senkenbergischen Anatomie an der Goethe Universität Frankfurt am Main

WEITERE TÄTIGKEITEN

07/1999 – 12/2000	Laborkraft bei der ACC GmbH in Pfungstadt
04/2000 und 04/2002	Studentische Hilfskraft in der Botanik an der TU Darmstadt
03/2003 und 08/2003	Betreuung des mikrobiologischen Grund- und Haupt-praktikums am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt
12/2005 – 09/2006	Kollegiatin des Graduiertenkollegs Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen an der Goethe Universität Frankfurt am Main

TAGUNGSBEITRÄGE

C. Unfried, C. von Gall (2005)

Comparison of differential gene expression in the pars tuberalis of wild-type- and MT1-melatonin receptor-deficient-mice. 10th Congress of European Pineal and Biological Rhythms Society, Frankfurt

C. Unfried, H.-W. Korf, C. von Gall (2006)

Differential gene expression in the pars tuberalis of wild-type- and MT1-melatonin receptor-deficient-mice. 23rd Conference of European Cooperative Endocrinologists, Manchester

C. Unfried, G. Burbach, H.-W. Korf, C. von Gall (2007)

Melatonin and the clock gene complex regulate rhythmic gene expression in the pars tuberalis. 102nd Annual meeting of the Anatomische Gesellschaft, Gießen

C. Unfried, S. Yasuo, H.-W. Korf, C. von Gall (2008)

Regulation of beta chain of thyroid stimulating hormone (Tshb) and Tsh receptor (Tshr) expression in the mouse pituitary and brain. 103rd Annual meeting of the Anatomische Gesellschaft, Innsbruck

C. Unfried, S. Yasuo, H.-W. Korf, C. von Gall (2008)

Regulation of beta chain of thyroid stimulating hormone (Tshb) and Tsh receptor (Tshr) expression in the mouse pituitary and brain. FASEB summer research conferences. Melatonin receptors: actions and therapeutics, Snowmass